القای تولیدمثل جنسی و تعیین تیپ‌های آمیزشی قارچ *Phaeoacremonium aleophilum* عامل بیماری اسکای مو در استان آذربایجان شرقی*

INDUCTION OF SEXUAL STAGE AND DETERMINATION OF MATING TYPES IN *Phaeoacremonium aleophilum*, THE CAUSAL AGENT OF ESCA DISEASE OF GRAPEVINE IN EAST AZARBAIJAN PROVINCE

ابوالفضل نرمانی، مهدی ارزنلو و اسداله بابای اهری[۱]**

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۱۱)

چکیده

قارچ *Togninia minima* (مرحله غیر جنسی: *Phaeoacremonium aleophilum*)، رایج‌ترین گونه *Phaeoacremonium* مرتبط با بیماری پتری و اسکای مو در دنیا به شمار می‌رود. این قارچ دارای سیستم آمیزشی هتروتالیک دو قطبی می‌باشد. برای تولید مثل جنسی وجود دو جدایه متفاوت از نظر تیپ آمیزشی ضروری می‌باشد. در تحقیق حاضر امکان القای مرحله جنسی جدایه‌های ایرانی این قارچ در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور در تابستان ۱۳۹۱ از تاکستان‌های مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی که دارای علایم بیماری اسکا بودند، نمونه‌برداری شد. جدایه‌های *Phaeoacremonium aleophilum* به دست آمده بر اساس صفات ریخت‌شناختی و آغازگرهای اختصاصی از قبل طراحی شده، مورد شناسایی قرار گرفتند. به منظور القای تولید مثل جنسی، تعداد چهار جدایه با منشأ جغرافیایی متفاوت دو به دو روی محیط کشت آب- آگار دارای ساقه‌های اتوکلاو شده مو (GWA) تلاقی داده شدند. پریتسیوم‌ها پس از سه الی چهار هفته نگهداری در دمای ۲۲ °C و نور سفید فلورسنت ظاهر گردیدند. مشخصات ریخت‌شناختی ساختارهای جنسی با مشخصات گونه *T. minima* مطابقت کامل نشان داد. دو جدایه با تیپ آمیزشی مخالف به عنوان جدایه‌های آزمایشگر انتخاب و تیپ آمیزشی ۳۴ جدایه *Pm. aleophilum* از طریق تلاقی با جدایه‌های آزمایشگر تعیین شد. نتایج این بررسی نشان داد که تیپ‌های آمیزشی بین جدایه‌های مورد مطالعه از توزیع غیر یکنواخت (۲:۱) برخوردار می‌باشد. تحقیق حاضر اولین مطالعه در راستای بررسی امکان وقوع تولید مثل جنسی *Pm. aleophilum* در ایران است.

واژه‌های کلیدی: جدایه آزمایشگر، زوال مو، هتروتالیسم، ژن *β-tubulin*

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arzanlou@hotmail.com
۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد بیماری شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

مقدمه

بیماری اسکا در مو به عنوان یک بیماری بسیار پیچیده در دنیا شناخته شده است و مجموعه‌ای از بیمارگرهای قارچی در ایجاد آن نقش دارند. دو گونه بازیدیومیست به نام‌های *Fomitiporia mediterranea* M Fischer و *Stereum hirsutum* (Willd. Fr) Pers؛ گونه (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai) Crous & W. Gams *Phaeomoniella chlamydospora* و چندین گونه از جنس *Phaeoacremonium* W. Gams, Crous & M.J. Wingf. به عنوان عوامل اصلی مرتبط با علایم بیماری اسکا روی مو در دنیا معرفی شده‌اند (Larignon & Dubos 1997; Fischer 2002, 2006; Mostert *et al.* 2006; Essakhi *et al.* 2008; Gramaje *et al.* 2009; Arzanlou *et al.* 2013a, 2014). جنس *Phaeoacremonium* در سال ۱۹۹۶ توسط *کراوس و همکاران* (Crous *et al.* 1996) معرفی گردید. از زمان توصیف *Phaeoacremonium* تا به امروز ۳۶ گونه از این جنس توصیف شده‌اند که از بین آنها، ۲۵ گونه از درختچه‌های مو با علایم زوال جداسازی گردیده‌اند (Crous *et al.* 1996; Mostert *et al.* 2005; Essakhi *et al.* 2008; Graham *et al.* 2009; Gramaje *et al.* 2009; Moyo 2013). گونه‌های *Phaeoacremonium* از بستره‌های اکولوژیک متنوعی جداسازی شده‌اند که از این بین می‌توان به بافت‌های آوندی گونه‌های گیاهی چوبی، انسان و نیز لارو سوسک‌های پوست‌خوار اشاره کرد (Crous *et al.* 1996; Mostert *et al.* 2005; Damm *et al.* 2008; Essakhi *et al.* 2008). تعدادی از گونه‌های این جنس از خاک نیز جدا شده‌اند (Dupont *et al.* 2000). اغلب گونه‌های *Phaeoacremonium*از میزبان‌های چوبی با علایم زوال جداسازی گردیده‌اند، در بین این میزبان‌ها، مو به عنوان میزبان اصلی گونه‌های این جنس مطرح است (Crous *et al.* 1996; Mostert *et al.* 2005; Arzanlou *et al.* 2013b, 2014). گونه *Pm. aleophilum* به عنوان گونه متداول مرتبط با بیماری اسکای مو در اغلب نقاط دنیا معرفی و بیماری‌زایی آن روی مو با بروز علایم تیپیک بیماری اسکا به اثبات رسیده است (Adalat *et al.* 2000; Feliciano *et al.* 2004; Arzanlou *et al.* 2013b, 2014; Mohammadi *et al.* 2013).

ارتباط بین *Togninia* و شکل غیرجنسی آن *Phaeoacremonium* برای اولین بار توسط موسترت و همکاران (Mostert *et al.* 2003) بر اساس آزمون‌های تلاقی در شرایط آزمایشگاه مشخص شد و یک سیستم آمیزشی هتروتال دو قطبی برای این گونه تأیید گردید. با این وجود تحقیقات قبلی سطوح بالایی از تنوع ژنتیکی را در جمعیت‌های *T. minima* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف دنیا نشان داده بودند که از وجود چرخه جنسی فعال و نوترکیبی مداوم در داخل جمعیت‌های این گونه حمایت می‌کرد (Tegli *et al.* 2000; Péros *et al.* 2000). رونی-لاتام و همکاران (Rooney-Latham *et al.* 2005a) در کالیفرنیا موفق به القای مرحله جنسی *Pm. aleophilum* در شرایط آزمایشگاهی شدند و در استرالیا، نگهداری بافت‌های چوبی آلوده مو به مدت دو الی پنج ماه در شرایط مرطوب در آزمایشگاه منجر به تشکیل پریتسیوم‌های *Togninia* شد (Pascoe *et al.* 2004). با این وجود گزارش‌های اندکی مبنی بر مشاهده تشکیل پریتسیوم‌های گونه *T. minima* در شرایط طبیعی وجود دارد. رونی-لاتام و همکاران (Rooney-Latham *et al.* 2005b) تشکیل پریتسیوم‌های گونه *T. minima* را روی بافت‌های آوندی مرده در محل ترک‌های عمیق روی تنه و

ساقه‌های جانبی و همچنین در سطوح پوسیده زخم‌های محل هرس شاخه از تاکستان‌های کالیفرنیا گزارش نموده‌اند. اخیراً، تشکیل پریتسیوم‌های گونه *T. minima* روی موهای آلوده به بیماری اسکا و پتری در تاکستان‌های آفریقای جنوبی گزارش شده است (Baloyi *et al.* 2013). با این وجود، اطلاعاتی در زمینه وقوع تولیدمثل جنسی گونه*Pm. aleophilum* در مناطق دیگر دنیا در دسترس نمی‌باشد.

مرحله جنسی اغلب گونه‌های جنس *Phaeoacremonium* ناشناخته باقی مانده است. از بین ۲۵ گونه *Phaeoacremonium* که از روی مو جداسازی شده‌اند، تنها مرحله جنسی هفت گونه شامل *T. minima*، *T. fraxinopennsylvanica*، *T. viticola*، *T. austroafricana*، *T. krajdenii*، *T. parasitica* و *T. rubrigena* شناسایی و توصیف شده است که مرحله جنسی سه گونه اول در طبیعت نیز ردیابی شده‌اند (Mostert *et al.* 2006). در بین گونه‌های جنس *Togninia*، دو گونه *T. novae-zealandiae* و *T. argentinensis* دارای سیستم آمیزشی هموتالیک می‌باشند (Mostert *et al.* 2006).

در قارچ‌های بیمارگر گیاهی، تولید مثل جنسی به دلیل اهمیت آن در نوترکیبی میوزی نقش مهمی در همه‌گیرشناسی بیماری‌های گیاهی ایفا می‌کند (Casselton 2008). تولید مثل جنسی در انتشار بیمارگر از طریق تولید آسکوسپور هوا برد و همچنین افزایش تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌ها از طریق نوترکیبی جنسی نقش دارد (Milgroom 1996; Turgeon 1998; Arzanlou *et al*. 2010; Bakhshi *et al.* 2011). با توجه به سیستم آمیزشی هتروتالیک دو قطبی در گونه *T. minima*، برای تشکیل شکل جنسی، وجود دو تیپ آمیزشی سازگار ضروری می‌باشد. بنابراین، اثبات وجود هر دو تیپ آمیزشی در یک منطقه حاکی از احتمال وقوع تولید مثل جنسی قارچ و در نتیجه وقوع نوترکیبی و تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت‌های قارچ عامل بیماری در منطقه است (Mostert *et al.* 2003). با توجه به خسارت‌زا بودن و اهمیت زیاد گونه *Pm. aleophilum* ، آگاهی از وضعیت تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌های قارچ عامل بیماری و همچنین آگاهی از شیوه تولید مثل قارچ در ایران جهت ارائه روش‌های مناسب مدیریت بیماری ضروری است. این تحقیق با هدف بررسی امکان وقوع تولیدمثل جنسی و وجود تیپ‌های آمیزشی در جدایه‌های ایرانی قارچ عامل بیماری با استفاده از روش تلاقی جدایه‌ها روی محیط‌های غذایی در شرایط آزمایشگاه انجام شد.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه، جداسازی و ریخت‌شناسی جدایه‌ها

تاکستان‌های مناطق عمده انگور خیز استان آذربایجان شرقی در تابستان ۱۳۹۱ مورد بازدید قرار گرفت و نمونه‌هایی از شاخه و تنه با نشانه‌های شاخص بیماری اسکا، جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. قطعاتی از نمونه آلوده به طول حدود سه الی چهار سانتی‌متر بریده شدند و در محلول هیپوکلریت سدیم رقیق شده (۱۰%) به مدت سه دقیقه ضد عفونی و به‌دنبال آن یک بار با آب مقطر سترون شستشو و با کاغذهای صافی سترون خشک شدند. سپس، قطعات کوچکی از بخش‌های میانی نواحی تغییر رنگ یافته و سالم بافت‌های آوندی برش داده شدند. قطعات زیر هود به مدت ۳۰ ثانیه در محلول هیپوکلریت سدیم رقیق شده (۳%) ضد عفونی شده و پس از سه بار شستشو در آب مقطر سترون با کاغذ صافی سترون آب‌گیری و به محیط غذایی عصاره مالت آگار (MEA؛

ساخت کارخانه مرک، کشور آلمان) دو درصد (حاوی ۲ میلی‌لیتر اسید لاکتیک ۲۰ درصد در لیتر) منتقل شدند. تشتک‌های پتری در تاریکی و در دمای ۲۵ °C نگهداری و به طور روزانه بررسی شدند و پرگنه‌های قارچی رشد یافته به روش تک اسپور کردن خالص شدند. در این بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های *Pm. aleophilum* طبق روش *موسترت و همکاران* (Mostert *et al*. 2006) و روی محیط عصاره مالت-آگار دو درصد (در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ °C) پس از ۷ الی ۱۰ روز نگهداری مطالعه شد. جهت مشاهده ساختارهای میکروسکوپی از روش کشت لام مطابق روش *ارزنلو و همکاران* (Arzanlou *et al*. 2007) استفاده شد.

استخراج DNA و تکثیر جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

برای این منظور، جدایه‌ها روی محیط کشت MEA به مدت ۱۰ روز در ۲۵ °C و در تاریکی رشد داده شدند و دی ان ای ژنومی با استفاده از روش *مولر و همکاران* (Moller *et al*. 1992) استخراج گردید. پس از اتمام عملیات استخراج، کمیت و کیفیت DNA به دست آمده به روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

برای شناسایی مولکولی *Pm. aleophilum* از دیگر گونه‌های این جنس از جفت آغازگر پیشرو (PmaleoF: CTCTGCGACGCGTCCCAGATTG) و پس‌رو (PmaleoR: TCGCGATGGCCCACTGCCTAC) استفاده شد که توسط *ارزنلو و همکاران* (۲۰۱۳a) بر مبنای توالی ژن *β–tubulin* طراحی شده‌اند. این جفت آغازگر قطعه‌ای به طول ۵۰۰ جفت باز را به صورت اختصاصی از جدایه‌های *Pm. aleophilum* تکثیر می‌نماید. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به مقدار ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۵ واحد آنزیم پلی‌مراز (Taq DNA polymerase)، بافر واکنش (1X PCR buffer)، ۰/۵ میلی‌مول کلرید منیزیوم، ۰/۲ میلی‌مول از هر dNTP، ۵ پیکومول از هر آغازگر و ۱۰ الی ۱۵ نانوگرم از DNA و آب دیونیزه استریل تهیه گردید. تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (GenAmp PCR System 9700) و با اعمال حرارت ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه و به دنبال آن ۳۶ چرخه شامل ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸° C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه جهت گسترش نهایی انجام شد. درجه حرارت دستگاه پس از انجام واکنش روی ۱۰°C برای مدت نامعلوم، جهت جلوگیری از تجزیه و تخریب محصول PCR تنظیم گردید. محصولات واکنش PCR از ژل آگاروز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید در بافر 1× TAE (20 mM acetic acid، 1mM EDTA (PH=8)، 40 mM Tris base) عبور داده شد و عکس‌برداری با استفاده از دستگاه تصویربرداری از ژل (Gel Documentation) انجام شد.

آزمون تلاقی جنسی جدایه‌ها

تلاقی جدایه‌ها مطابق روش *موسترت و همکاران* (Mostert *et al*. 2003) روی محیط ساقه مو-آب آگار (GWA) حاوی قطعات اتوکلاو شده مو صورت پذیرفت. برای این منظور قطعاتی به اندازه تقریبی نیم الی یک سانتی‌متر مربع از ساقه‌های چند ساله درختچه مو تهیه شد و قطعات در داخل بطری‌های درپیچ‌دار نیم لیتری شیشه‌ای دو بار و در دو روز متوالی با استفاده از اتوکلاو استریل گردیدند و تعداد هشت الی ۱۰ قطعه چوب اتوکلاو شده به داخل تشتک پتری حاوی آگار دو درصد منتقل شدند.

تعداد چهار جدایه *Pm. aleophilum* به منظور اسپورزایی به مدت دو هفته در محیط کشت MEA دو درصد کشت داده شدند. با خراش دادن سطح پرگنه هر یک از جدایه‌ها و اضافه کردن کنیدیوم‌های آنها به پنج میلی لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیونی از اسپور تهیه شد. سپس ۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور جدایه‌ها دو به دو در تمامی حالات ممکن روی محیط کشت GWA پخش شدند. در مورد شاهد، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور هر جدایه روی محیط کشت ساقه مو-آب آگار پخش شد. تشتک‌های پتری حاوی اسپور جدایه‌ها در زیر نور سفید فلورسنت و تحت دمای $22\ ^{\circ}C$ نگهداری شدند. پس از سه الی چهار هفته ویژگی‌های ریخت-شناختی ساختارهای جنسی از طریق ایجاد برش مورد بررسی قرار گرفتند.

تعیین تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های *Phaeoacremonium aleophilum*

برای این منظور چهار جدایه *Pm. aleophilum* دو به دو روی محیط کشت GWA تلاقی داده شدند. از بین چهار جدایه مورد بررسی دو جدایه با تیپ آمیزشی متفاوت به عنوان جدایه‌های آزمایش‌گر با تیپ آمیزشی A و B انتخاب گردیدند و تیپ آمیزشی ۳۲ جدایه *Pm. aleophilum* از طریق تلاقی با جدایه‌های آزمایشگر مطابق روش فوق تعیین شد.

نتیجه و بحث

جدایه‌های قارچی

در این بررسی تعداد ۳۴ جدایه *Phaeoacremonium* از درختچه‌های مو دارای علایم بیماری اسکا جداسازی گردید (جدول ۱). مشخصات میکروسکوپی جدایه‌های به دست آمده با مشخصات گونه *Pm. aleophilum* مطابقت داشت. مشخصات قارچ: میسلیوم منشعب، دیواره‌دار، اغلب منفرد و یا در گروه‌های چند تایی. دارای بافت صاف، به رنگ قهوه‌ای روشن تا نیمه شفاف، دارای زگیل‌هایی تا ۱/۵ میکرومتر. کنیدیوفور به اندازه ۲/۵ - ۱/۵ (۱-) × (۶۱-) ۴۵/۵-۱۸ (۱۶-) میکرومتر، اغلب کوتاه و منشعب، اغلب به شکل راست و در قاعده باریک، به رنگ قهوه‌ای روشن تا زرد و در انتها شفاف، دارای بافتی زگیل‌دار، فیالیدها جانبی یا انتهایی، اغلب مونوفیالیدیک، صاف و به رنگ قهوه‌ای کم رنگ تا شفاف، فیالیدهای نوع II و III غالب، فیالید نوع I به اندازه ۲-۱ × (۹-) ۷/۵-۲/۵ (۲-) میکرومتر، به شکل استوانه‌ای و گاهی در پایه عریض، فیالید نوع II به اندازه ۲-۱/۵ (۱-) × (۱۶-) ۱۵/۵-۱۰ میکرومتر، آمپولی طویل تا استوانه‌ای، در قاعده منقبض، فیالید نوع III به اندازه (۲/۵-) ۲-۱ × ۲۴-۱۶ (۱۵-) میکرومتر، آمپولی طویل تا نوک تیز، در قاعده کمی باریک، دارای گردن، به رنگ قهوه‌ای کم رنگ تا شفاف و زگیل دار، کنیدیوم ها اغلب استوانه‌ای تا تخم مرغی وارونه و گاهی دوکی، زرد تا شفاف، به اندازه (۲-) ۱/۵-۱ × ۶-۲/۵ (۲-) میکرومتر.

قطر پرگنه بعد از هشت روز نگهداری روی محیط کشت MEA و در دمای $25\ ^{\circ}C$، ۱۱- ۲/۵ میلی‌متر، پرگنه گرد، صاف، دارای بافت نمدی، سفید مایل به زرد، رنگ پرگنه از پشت زرد کم رنگ، مشاهده ریسه‌های سفید روی پرگنه بعد از ۱۶ روز. پرگنه روی PDA گرد، صاف، دارای بافت نمدی، بعد از هشت روز به رنگ قهوه ای کم رنگ، رنگ پرگنه از پشت نارنجی مایل به قهوه‌ای. پرگنه روی OA (آرد یولاف- آگار) صاف، بعد از هشت روز در مرکز حاوی کرک‌های سفید مایل به زرد کم پشت،

سفید مایل به زرد، بعد از ۱۶ روز به طـرف حاشـیه کلنـی PDA و OA.
زرد مایل به خاکستری، تولید رنگدانه زرد در محیط کشت

جدول ۱. منشا جغرافیایی و توزیع تیپ‌های آمیزشی بین جدایه‌های *Togninia minima* بررسی شده در این تحقیق

Table 1. Geographical origin and distribution of mating types among of *Togninia minima* isolates examined in this study

منطقه نمونه برداری(Sampling site)	جدایه‌ها(Isolates)	تیپ آمیزشی(Mating type)	
		A	B
آذرشهر (شیرامین) Azarshahr (Shiramine)	CCTU 1273	+	
آذرشهر (شیرامین) Azarshahr (Shiramine)	CCTU 1266		+
آذرشهر (شیرامین) Azarshahr (Shiramine)	CCTU 1268		+
آذرشهر (سیلاب) Azarshahr (Silab)	CCTU 1264	+	
آذرشهر (سیلاب) Azarshahr (Silab)	CCTU 1269	+	
آذرشهر (سیلاب) Azarshahr (Silab)	CCTU 1304	+	
آذرشهر (سیلاب) Azarshahr (Silab)	CCTU 1279		+
آذرشهر (سیلاب) Azarshahr (Silab)	CCTU 1277		+
آذرشهر (سیلاب) Azarshahr (Silab)	CCTU 1285		+
آذرشهر (سیلاب) Azarshahr (Silab)	CCTU 1287		+
آذرشهر (خانقاه) Azarshahr (Khanegah)	CCTU 1275	+	
آذرشهر (خانقاه) Azarshahr (Khanegah)	CCTU 1262	+	
آذرشهر (خانقاه) Azarshahr (Khanegah)	CCTU 1307	+	
آذرشهر (خانقاه) Azarshahr (Khanegah)	CCTU 1270	+	
آذرشهر (خانقاه) Azarshahr (Khanegah)	CCTU 1320		+
آذرشهر (خانقاه) Azarshahr (Khanegah)	CCTU 1251		+
آذرشهر (خانقاه) Azarshahr (Khanegah)	CCTU 1252		+
آذرشهر (خانقاه) Azarshahr (Khanegah)	CCTU 1253		+
آذرشهر (خانقاه) Azarshahr (Khanegah)	CCTU 1257		+
آذرشهر (خانقاه)Azarshahr (Khanegah)	CCTU 1272		+
آذرشهر (خانقاه)Azarshahr (Khanegah)	CCTU 1278		+
آذرشهر (خانقاه) Azarshahr (Khanegah)	CCTU 1280		+
آذرشهر Azarshahr	CCTU 1258		+
آذرشهر Azarshahr	CCTU 1259		+
آذرشهر Azarshahr	CCTU 1261		+
عجب شیر(هروان) Ajabshir (Harvan)	CCTU 1289	+	
عجب شیر(هروان)Ajabshir (Harvan)	CCTU 1291	+	
عجب شیر(خانیان) Ajabshir (Harvan)	CCTU 1318		+
ملکان Malekan	CCTU 1290		+
ملکان Malekan	CCTU 1312		+
ملکان Malekan	CCTU 1292		+
کشکسرای Koshksaray	CCTU 1322	+	

کشکسرای Koshksaray	CCTU 1323	+	
شبستر Shabestar	CCTU 1336		+

از صفات مهم و متمایزکننده گونه *Pm. aleophilum* از سایر گونه‌های این جنس داشتن کنیدیوفورهای غیر منشعب، غالب بودن فیالیدهای نوع II و III و طویل بودن فیالیدهای نوع III تا ۲۴ میکرومتر می‌باشد. این گونه از نظر صفات ریخت شناختی شبیه گونه *Pm. iranianum* است، با این وجود گونه *Pm. aleophilum* به واسطه تولید رنگدانه زرد و قابلیت رشد در دمای ۴۰°C از *Pm. iranianum* قابل تشخیص است.

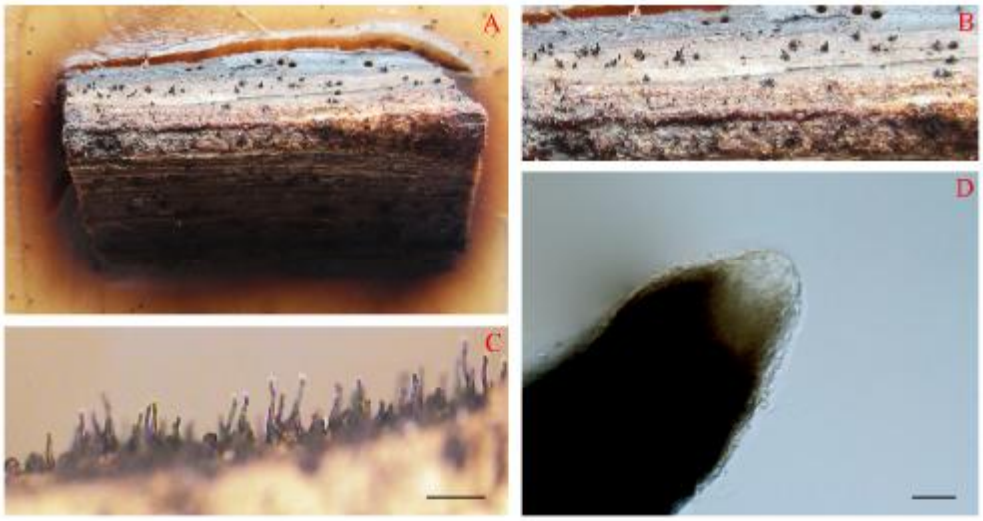
تکثیر با آغازگرهای اختصاصی ژن *β–tubulin*

نتایج حاصل از بررسی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگاروز نشان داد که جفت آغازگر PmaleoF/PmaleoR قطعه‌ای به اندازه ۵۰۰ جفت باز فقط از جدایه‌های *Pm. aleophilum* تکثیر نمودند. به‌این ترتیب هویت جدایه‌های *Pm. aleophilum* لیست شده در جدول ۱ با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی این گونه تأیید شد. به طور کلی، شناسایی گونه‌های جنس *Phaeoacremonium* تنها با اتکا به صفات ریخت‌شناسی ممکن است منجر به نتیجه‌گیری‌های نادرست شود. این نقص عمدتاً ناشی از کم بودن صفات ریخت شناختی بارز جهت تفکیک گونه‌ها از همدیگر و همپوشانی صفات ریخت شناسی بین گونه‌های این جنس می‌باشد (Arzanlou *et al.* 2013a, 2014). به خاطر این محدویت‌ها، توجه ویژه‌ای به کاربرد روش‌های مولکولی برای شناسایی گونه‌های این جنس توسط محققین مختلف معطوف گردیده است. موسترت و همکاران (Mostert *et al.* 2006) از طریق طراحی آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی ژن‌های *بتاتوبولین* و *اکتین*، امکان شناسایی مولکولی ۲۲ گونه *Phaeoacremonium* را با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه فراهم کردند. با این وجود، در حال حاضر تعداد گونه‌های توصیف شده این جنس به ۳۶ گونه افزایش پیدا کرده است. بنابراین، طراحی آغازگرهای جدید برای شناسایی گونه‌هایی که در سال‌های اخیر توصیف شده‌اند، ضروری است.

نتایج آزمون تلاقی و تعیین تیپ‌های آمیزشی

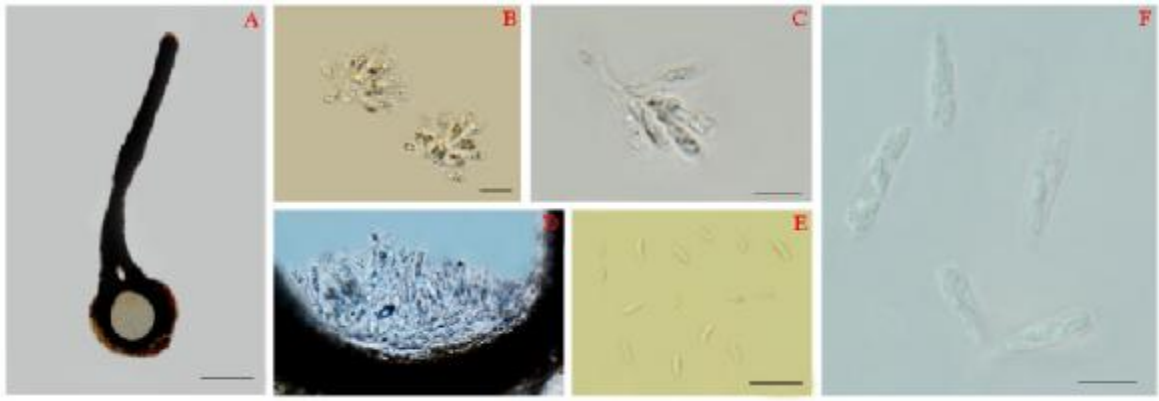
حدود ۲۵ روز بعد از تلاقی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی، پریتسیوم‌های اولیه شروع به تشکیل روی سطح قطعات چوب و محیط آگار نمودند (شکل ۱). بلوغ پریتسیوم‌ها به صورت تدریجی و پس از گذشت ۴۵ تا ۶۰ روز نگهداری اتفاق افتاد (شکل ۲). مشخصات ساختارهای جنسی به شرح زیر بود. پریتسیوم‌های قارچ به رنگ سیاه، کروی و نیم کروی، با گردن کشیده و خمیده به صورت منفرد یا گروهی، گاهی دارای بیش از یک گردن و یا دارای گردن منشعب و خمیده، اندازه پریتسیوم‌ها (۴۰۰-) ۳۳۰-۲۶۰ (۱۸۰-) × (۳۹۰-) ۳۰۰-۲۴۰ (۱۶۰-) میکرومتر، طول گردن پریتسیوم‌ها بعد از ۱۰۵ روز، ۲۵۰ الی ۱۳۰۰ میکرومتر، عرض آنها در قسمت میانی ۷۰-۴۰ میکرومتر، به محض بلوغ پریتسیوم‌ها توده ژلاتینی آسکوسپورهای قارچ در روی دهانه پریتسیوم قابل مشاهده بود (شکل ۲). تشکیل آسک‌های دوکی تا گرزی شکل، شفاف، یک جداره ، به صورت تارک سو (آکروپتال) و هم پایه (سیمپودیال) از ریسه آسک زا (شکل ۲)، اندازه آسک‌ها (۲۵-) ۲۱/۵-۱۹/۸ (۱۸-) × (۶-) ۴/۶۷-۴/۲ (۴-) میکرومتر، آسکوسپورها شفاف، بیضی شکل تا کشیده، خمیده (آلانتوئید) و گاه دارای

ذرات چربی در دو طرف آسکوسپور، اندازه آسکوسپورها (۸-) ۷-۶/۶ (-۶) × ۲-۱/۵ میکرومتر. با مقایسه صفات ریخت‌شناختی به دست آمده با توصیف‌های صورت گرفته توسط موسترت و همکاران (Mostert *et al*. 2003)،



شکل ۱. A-C: پریتسیوم‌های *Togninia minima* تشکیل شده روی قطعات اتوکلاو شده چوب مو؛ D: آسکوسپورهای در حال خروج از دهانه پریتسیوم؛ مقیاس C: ۵۰۰ میکرومتر؛ D: ۱۰ میکرومتر

Fig. 1. A-C: Perithecia of *Togninia minima* formed on autoclaved grapevine cane segments; D: Mass of ascospores oozing out from the tip of perithecial neck; Scale bars, C = 500 µm, D = 10 µm



شکل ۲. *Togninia minima*. A: پریتسیوم؛ B, C: تجمع آسک‌ها روی ریسه آسک‌زا؛ D: برش عمودی از پریتسیوم که توده آسک‌ها در داخل آن نمایان می‌باشد؛ E, F: آسک‌های حاوی آسکوسپور و آسکوسپورها؛ مقیاس A: ۱۰۰ میکرومتر؛ B-F: ۱۰ میکرومتر

Fig. 2. *Togninia minima*. A: Perithecium; B, C: Ascus aggregates on ascogenous hyphae; D: Vertical section through a perithecium; E, F: Asci containing ascospores and ascospores; Scale bars, A = 100 µm, B-F = 10 µm

رونی-لاتام و همکاران (Rooney-Latham *et al*. 2005 a, b)، گونه مورد نظر *Togninia minima* تشخیص داده شد.

نتایج حاصل از تلاقی ۳۲ جدایه *Pm. aleophilum* جمع‌آوری شده از تاکستان‌های استان آذربایجان شرقی (جدول ۱) با دو جدایه آزمایشگر *Pm. aleophilum* نشان

داد که هر دو نوع تیپ آمیزشی در بین جدایه‌های این قارچ از تاکستان‌های مختلف استان و همچنین در یک درختچه نیز حضور دارند. از بین ۳۴ جدایه مورد بررسی، ۲۲ جدایه از یک نوع تیپ آمیزشی (A) و ۱۲ جدایه از تیپ آمیزشی مخالف (B) بودند. حضور هر دو نوع تیپ آمیزشی در داخل جمعیت‌های این قارچ نشان‌دهنده پتانسیل بالقوه لازم برای وقوع چرخه جنسی در بین جدایه‌های این قارچ است. با این وجود، در بازدیدهای به عمل آمده از تاکستان‌های منطقه، ساختارهای جنسی در شرایط طبیعی دیده نشد. با توجه به القای موفقیت آمیز مرحله جنسی در شرایط آزمایشگاه، به نظر می‌رسد که جدایه‌های این گونه از ساز و کارهای ژنتیکی لازم برای تولید مثل جنسی و باروری برخوردار باشند و احتمالا شرایط محیطی حاکم در منطقه به عنوان یک مانع اصلی در وقوع چرخه جنسی این گونه عمل می‌کند. به طور کلی در جمعیت‌هایی که توزیع تیپ‌های آمیزشی از نسبت مساوی و یا نزدیک به مساوی برخوردار باشند، وقوع منظم چرخه جنسی دور از انتظار نیست (Milgroom 1996). در بین نمونه‌های بررسی شده در این تحقیق تیپ‌های آمیزشی از توزیع یکنواخت برخوردار نبودند و یکی از تیپ‌های آمیزشی از فراوانی بیشتری برخوردار بود (جدول ۱). بررسی‌های چندانی در مورد توزیع تیپ‌های آمیزشی *Pm. aleophilum* در دیگر مناطق دنیا انجام نشده است و نتایج این بررسی‌ها نشان داده است که در مناطق نمونه‌برداری شده (ایالت کالیفرنیا، استرالیا و اسپانیا) تیپ‌های آمیزشی از توزیع یکنواخت (۱:۱) برخوردار بوده‌اند (Rooney-Mostert Latham *et al.* 2005a,b; Gramaje *et al.* 2013 *et al.* 2003; Pasco *et al.* 2004;). در تحقیق حاضر تعداد ۳۴ جدایه *Pm. aleophilum* مورد بررسی قرار گرفت که در بین آنها توزیع تیپ‌های آمیزشی از نسبت مساوی برخوردار نبود. عوامل مختلفی ممکن است در توزیع نابرابر تیپ‌های آمیزشی در جمعیت‌های قارچ‌های بیمارگر گیاهی و یا انسانی دخیل باشند که از این بین می‌توان به انتخاب وابسته به تیپ آمیزشی در داخل جمعیت، یا ورود اخیر یک تیپ آمیزشی به منطقه و یا اختلاف در پرآزاری بین تیپ‌های آمیزشی متفاوت اشاره کرد (Milgroom 1996; Turgeon 1998; Arzanlou *et al.* 2010; Bakhshi *et al.* 2011). با این وجود، قبل از هرگونه اظهار نظر نهایی در خصوص توزیع غیر یکنواخت تیپ‌های آمیزشی در جمعیت‌های *Pm. aleophilum*، مطالعه توزیع تیپ‌های آمیزشی در جمعیت‌های مختلف این گونه در مقیاس‌های مختلف (یک درختچه مو، یک تاکستان، تاکستان‌های مختلف در یک منطقه و مناطق مختلف) ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز به خاطر تأمین بودجه لازم برای انجام تحقیق حاضر و از آقایان مهندس حسین زاهدی کارشناس آزمایشگاه بیماری‌های گیاهی گروه گیاه‌پزشکی و مهندس علی چناری بوکت دانشجوی دوره دکتری رشته بیماری‌شناسی گیاهی به خاطر کمک در تهیه عکس‌های ماکروسکوپی ابراز می‌دارند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (137-135) متن انگلیسی مراجعه شود.