مجله دانش گیاهپزشکی ایران
دوره ۴۱، شماره ۱، ۱۳۸۹ (۷۹-۷۱)

بررسی باروری جنسی و تعیین گروه‌های سازگاری رویشی در جدایه‌های *Glomerella cingulata* جدا شده از درختان مرکبات استان مازندران

مونا خوانساری عتیق[۱]، محمد جوان نیکخواه[۲]*، اکبر خداپرست[۳]، ماریه ببری[۴] و کیوان غضنفری[۵]
۱، ۲، ۵، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و کارشناس ارشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۳، دانشیار دانشگاه گیلان، رشت، ۴، کارشناس ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران
(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۱۱ - تاریخ تصویب: ۸۹/۴/۱)

چکیده

قارچ *Glomerella cingulata* عامل بیماری آنتراکنوز درختان مرکبات در شمال و جنوب ایران است. ۶۷ جدایه تک اسپور شده به دست آمده از درختان مرکبات استان مازندران برای این بررسی استفاده شد. تشخیص هموتال و هتروتال بودن قارچ در این آزمایش روی محیط اختصاصی YPSS انجام شد. برای تشخیص هموتال بودن، ابتدا جدایه‌ها به تنهایی روی این محیط کشت شدند و در نور متناوب و دمای ۲۱°C به مدت ۲۱-۱۵ روز قرار گرفتند. ارزیابی‌ها نشان دادند که ۸/۸٪ جدایه‌ها در کشت منفرد تولید پریتسیوم کردند و هموتال می‌باشند و سایر جدایه‌ها در کشت‌های منفرد تولید پریتسیوم نکردند. در تلاقی بین جدایه‌ها تحت شرایط فوق، تنها برای ۱۲ تلاقی پریتسیوم بارور تولید گردید و ۲۵٪ از جدایه‌ها به عنوان هتروتال تشخیص داده شدند. پریتسیوم‌های حاصل گرد با گردن دراز و دیواره صاف بودند. آسک‌ها به صورت مجتمع داخل پریتسیوم‌ها قرار گرفته و هر آسک دارای هشت آسکوسپور تک سلولی بود. از بین ۶۷ جدایه ۴۱ جدایه برای شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی مورد آزمایش قرار گرفتند. جدایه‌ها برای به دست آمدن جهش یافتگان *nit* روی محیط واجد کلرات پنج درصد کشت شدند. تشخیص فنوتیپ جهش یافتگان *nit* به کمک محیط های افتراقی واجد نیتروژن انجام شد. سه جهش یافته *nit 1*، *nit* 3 و *nit* M به ترتیب با فراوانی ۶۶٪، ۵۶٪ و۵۳٪ شناسایی شدند. برای گروه‌بندی جدایه‌ها، تلاقی جهش یافتگان *nit* جدایه‌های مختلف روی محیط MM انجام شد که ابتدا تلاقی‌های درون جدایه‌ای انجام شد تا جدایه‌های HSI حذف شوند که دو جدایه خود ناسازگار بودند. در آزمایش‌های سازگاری رویشی تمامی کشت‌ها و تلاقی‌ها در دمای ۲۵°C و در تاریکی قرار گرفتند. در تلاقی جهش یافتگان *nit* جدایه‌های مختلف، به جز سه تلاقی از کل، سایر تلاقی‌ها نتوانستند هتروکاریون تشکیل دهند. با بررسی‌ها دو گروه دو عضوی به دست آمد ولی سایر جدایه‌ها نتوانستند در تلاقی‌های بین جدایه‌ای هتروکاریون تشکیل دهند، اما با این حال نامگذاری شدند. جدایه‌هایی که در آزمایش باروری جنسی توانایی تشکیل پریتسیوم را داشتند (هموتال و هتروتال) با جدایه‌هایی که در بررسی گروه‌های سازگاری رویشی تشکیل هتروکاریون دادند، متفاوت بودند. در این آزمایش اکثر جدایه‌ها نتوانستند در تلاقی‌های بین جدایه‌ای هتروکاریون تشکیل دهند و به صورت تک عضوی باقی ماندند که بیانگر تنوع در بین جدایه‌ها می‌باشد. عامل ایجاد تنوع را می‌توان وجود چرخه جنسی و جهش دانست که در این تحقیق وجود باروری جنسی اثبات شد.

واژه‌های کلیدی: جهش یافتگان *nit*، هتروکاریون، هتروتالیک، هموتالیک.

* نویسنده مسئول: محمد جوان نیکخواه تلفن: ۰۲۶۱-۲۸۱۸۷۰۵ E-mail: jnikkhah@ut.ac.ir

مقدمه

قارچ *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Schrenk. (آنامورف: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz.& Sacc.) دارای طیف میزبانی وسیع می‌باشد و تنوع زیادی در مورفولوژی و بیولوژی دارد (Edgerton, 1914). این قارچ به درختانی که ضعیف شده باشند حمله می‌کند و باعث مرگ و خشکیدگی بافت آسیب دیده می‌شود. آسروول های کوچک سیاه در دوایر متحدالمرکز روی ناحیه مرده به وجود می‌آیند. برگ‌ها در ناحیه آسیب دیده زرد و پژمرده شده و می‌افتند. روی سطح میوه نیز لکه‌های مدور و فرورفته ایجاد می‌شود. تعداد زیادی آسروول های جوش مانند روی قسمت‌های مرده شاخه به وجود می آیند (Agrios, 2005). مرحله جنسی قارچ به ندرت در طبیعت مشاهده می‌شود که به نام *G. cingulata* شناسایی شده است (Atkinson, 1892). با وجود این، می‌توان فرم جنسی قارچ را در شرایط خاص روی محیط‌های غذایی ویژه در آزمایشگاه تولید کرد.

قارچ *G. cingulata* در طبیعت نسبت به سایر گونه‌های این جنس مانند *G. acutata* و *G. graminicola* بیشتر مشاهده می‌شود (Du, *et al.*, 2005). عدم تشکیل فرم جنسی در طبیعت می‌تواند چند علت داشته باشد که از جمله عدم وجود شرایط آب و هوایی مناسب و همچنین عدم توانایی قارچ به طور ژنتیکی برای تشکیل فرم جنسی باشند (Viallancourt & Hanau, 1991). به طور کلی تولید پریتسیوم وابستگی زیادی به شرایط محیطی دارد. همچنین پریتسیوم در دماهای ۱۵°C و ۲۸°C به راحتی تولید می‌شود (Mamandhar *et al.*, 1986). جنس *Glomerella* از قارچ‌های آسکومیست رشته ای است و در رده Sordariomycetes، راسته Phyllachorales قرار دارد (Hibbett *et al.*, 2007). در گونه *G. cingulata* هم انواع هموتال و هم انواع هتروتال یافت می‌شود. در جدایه‌های هتروتال پریتسیوم‌ها در خط تماس دو جدایه در وسط تشکیل می‌شوند. جدایه‌های هتروتال از هموتال‌ها ایجاد می‌شوند که این امر در اثر جهش در ژن‌های درگیر در تولید مثل جنسی رخ می‌دهد (Wheeler, 1956).

از آن جایی که تشکیل فرم جنسی به ندرت اتفاق می‌افتد، تعیین گروه‌های سازگاری رویشی در گروه‌بندی قارچ می‌تواند مفید باشد. به طور کلی ایجاد تنوع می‌تواند به دلیل ایجاد سیکل شبه جنسی و یا تشکیل هتروکاریون از طریق گروه‌های سازگاری رویشی صورت گیرد (Brooker *et al.*, 1990). سازگاری رویشی مربوط به آناستوموز هیف‌ها می‌باشد که تشکیل هتروکاریون می‌دهند. به عبارت دیگر سازگاری رویشی زمانی اتفاق می‌افتد که دو هیف رویشی قادر به آناستوموز و امتزاج و ایجاد هتروکاریون پایدار باشند. ناسازگاری رویشی[1] در برخی قارچ‌ها مثل بازیدیومیست‌ها توسط ژن‌های تعیین‌کننده تیپ آمیزشی[2] کنترل می‌شود در صورتی که در اغلب آسکومیست‌ها توسط لوکوس‌های *vic* کنترل می‌شود. فقط جدایه‌هایی که دارای آلل‌های یکسان در تمام لوکوس‌های *vic* باشند قادر به تشکیل هتروکاریون پایدار هستند. دو جدایه که تشکیل هتروکاریون دهند در یک گروه سازگاری رویشی قرار می‌گیرند (Leslie, 1993). ۷-۳ ژن در *G. cingulata* کنترل‌کننده سازگاری رویشی می‌باشند (Correll *et al.*, 2000).

اهداف این تحقیق، مطالعه باروری جنسی جدایه‌ها از طریق تلاقی آنها روی محیط غذایی ویژه، تعیین وضعیت باروری جدایه‌ها از نظر هتروتالیک و هموتالیک بودن آنها و بررسی سازگاری رویشی در بعضی جدایه‌های به دست آمده از درختان مرکبات و شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی بوده است.

مواد و روش‌ها

بررسی باروری جنسی

شصت و هفت جدایه تک اسپور که از درختان مرکبات استان مازندران به دست آمده بودند، برای بررسی توانایی باروری جنسی و تعیین هموتال و هتروتال بودن آنها در شرایط آزمایشگاه مورد آزمایش قرار گرفتند (جدول ۱). ابتدا هر جدایه روی محیط WA (آب آگار) ۲٪ کشت شد و در دمای ۲۵°C و در

1. Vegetative incompatibility
2. Mating type

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *Glomerella cingulata* جدا شده از درختان مرکبات در مناطق مختلف استان مازندران

ردیف	تاریخ نمونه‌برداری	جدایه	میزبان	محل جغرافیایی	منشأ
۱	۸۳/۳/۲۱	Cg14*	نارنگی کلمانتین	رامسر	شاخه
۲	۸۳/۵/۱۲	Cg24*	کامکوات	سلیمان آباد	شاخه
۳	۸۳/۶/۵	Cg3	پرتقال تامسون	نوشهر	شاخه
۴	۸۳/۶/۵	Cg47*	دارابی	نوشهر	شاخه
۵	۸۳/۶/۱۴	Cg55	نارنگی پیج	چالوس	شاخه
۶	۸۴/۱/۱۸	Cg28	پرتقال مورو	آمل	شاخه
۷	۸۴/۱/۱۸	Cg2	پرتقال هاملین	بابل	شاخه
۸	۸۴/۱/۱۸	Cg31*	پرتقال تامسون	بابل	شاخه
۹	۸۴/۱/۱۹	Cg18	نارنگی انشو	بابل	شاخه
۱۰	۸۴/۱/۲۲	Cg45*	نارنگی پیج	تنکابن	شاخه
۱۱	۸۴/۱/۲۴	Cg17	پرتقال تامسون	بابلسر	شاخه
۱۲	۸۴/۱/۲۷	Cg25*	راف لمون	بابلسر	شاخه
۱۳	۸۴/۱/۳۰	Cg23	نارنگی پیج	بهشهر	شاخه
۱۴	۸۴/۲/۴	Cg66	نارنج	خزانه تنکابن	شاخه
۱۵	۸۴/۲/۵	Cg33*	پرتقال والنسیا	تنکابن	شاخه
۱۶	۸۴/۲/۵	Cg52	نارنگی پیج	عباس آباد	شاخه
۱۷	۸۴/۲/۷	Cg58*	نارنگی کلمانتین	ساری	شاخه
۱۸	۸۴/۲/۷	Cg20	نارنگی انشو	ساری	شاخه
۱۹	۸۴/۲/۷	Cg60	کامکوات	ساری	شاخه
۲۰	۸۴/۲/۸	Cg10*	پرتقال والنسیا	ساری	شاخه
۲۱	۸۴/۲/۲۴	Cg69	نارنگی لی	تنکابن	شاخه
۲۲	۸۴/۲/۲۴	Cg5*	نارنگی کینگ	تنکابن	شاخه
۲۳	۸۴/۲/۲۴	Cg22*	سلطان مرکبات	تنکابن	شاخه
۲۴	۸۴/۲/۸	Cg64	پرتقال مورو	ساری	شاخه
۲۵	۸۴/۲/۱۲	Cg49	پرتقال دورگ	نکا	شاخه
۲۶	۸۴/۲/۱۴	Cg52*	لیمو شیرین	سوادکوه	شاخه
۲۷	۸۴/۲/۱۴	Cg29*	نارنگی پیج	تنکابن	شاخه
۲۸	۸۴/۲/۲۴	Cg34*	لیموترش	تنکابن	شاخه
۲۹	۸۳/۳/۲۲	Cg30*	لیموشیرین	رامسر	برگ
۳۰	۸۳/۶/۵	Cg1	نارنگی پیج	تنکابن	برگ
۳۱	۸۳/۶/۵	Cg73	نارنگی انشو	نوشهر	برگ
۳۲	۸۳/۶/۲	Cg51*	دارابی	رامسر	برگ
۳۳	۸۳/۶/۵	Cg72	نارنگی کلمانتین	نوشهر	برگ
۳۴	۸۳/۶/۱۴	Cg63*	پرتقال تامسون	چالوس	برگ
۳۵	۸۳/۶/۱۴	Cg65	نارنگی انشو	چالوس	برگ
۳۶	۸۴/۱/۲۷	Cg53*	کامکوات	قائمشهر	برگ
۳۷	۸۴/۲/۴	Cg35	نارنج	تنکابن	برگ
۳۸	۸۴/۲/۷	Cg68*	نارنگی محلی	ساری	برگ
۳۹	۸۴/۲/۲۴	Cg37	نارنگی مورکات	تنکابن	برگ
۴۰	۸۴/۲/۱۲	Cg39*	پرتقال مورو	نکا	برگ
۴۱	۸۴/۲/۱۵	Cg70	پرتقال والنسیا	جویبار	برگ
۴۲	۸۴/۲/۱۵	Cg12*	نارنج	نارنج	برگ
۴۳	۸۴/۲/۱۴	Cg74*	لیموترش	سوادکوه	برگ
۴۴	۸۴/۲/۱۹	Cg42*	نارنگی انشو	قائمشهر	ناف میوه نارس

ادامه جدول ۱-

ردیف	تاریخ نمونه‌برداری	جدایه	میزبان	محل جغرافیایی	منشأ
۴۵	۸۴/۲/۲۰	Cg8*	نارنگی کلمانتین	قائمشهر	ناف میوه نارس
۴۶	۸۳/۵/۱۰	Cg4	پرتقال تامسون	ساری	ناف میوه نارس
۴۷	۸۴/۲/۱۹	Cg62*	نارنگی انشو	قائمشهر	ناف میوه نارس
۴۸	۸۴/۲/۲۰	Cg67	پرتقال تامسون	بهشهر	ناف میوه نارس
۴۹	۸۴/۲/۲۰	Cg15*	نارنگی کلمانتین	بهشهر	ناف میوه نارس
۵۰	۸۳/۵/۱۲	Cg26*	پرتقال تامسون	سلیمان آباد	ناحیه ریزش میوه بعد از گلدهی
۵۱	۸۴/۲/۱۷	Cg6*	نارنگی انشو	آمل	ناحیه ریزش میوه بعد از گلدهی
۵۲	۸۴/۲/۱۷	Cg19*	نارنگی کلمانتین	آمل	ناحیه ریزش میوه بعد از گلدهی
۵۳	۸۴/۲/۱۷	Cg50*	نارنگی انشو	بابل	ناحیه ریزش میوه بعد از گلدهی
۵۴	۸۴/۱/۱۸	Cg16	پرتقال والنسیا	آمل	ناحیه ریزش میوه بعد از گلدهی
۵۵	۸۴/۱/۱۸	Cg11*	پرتقال محلی	بابل	ناحیه ریزش میوه بعد از گلدهی
۵۶	۸۴/۲/۱۴	Cg27*	لیموترش	سوادکوه	ناحیه ریزش میوه
۵۷	۸۳/۱۰/۲۸	Cg36*	دارابی	رامسر	میوه رسیده
۵۸	۸۳/۱۱/۲۸	Cg43	دارابی	رامسر	میوه رسیده
۵۹	۸۳/۱۱/۲۸	Cg46*	پرتقال والنسیا	رامسر	میوه رسیده
۶۰	۸۴/۱/۱۸	Cg48*	پرتقال تامسون ناول	آمل	میوه رسیده
۶۱	۸۴/۱/۲۷	Cg56*	پرتقال تامسون ناول	قائمشهر	میوه رسیده
۶۲	۸۴/۲/۱۲	Cg38*	پرتقال والنسیا	نکا	میوه رسیده
۶۳	۸۴/۲/۱۴	Cg7	پرتقال والنسیا	سوادکوه	میوه رسیده
۶۴	۸۴/۲/۱۴	Cg32*	لیموترش	سوادکوه	میوه رسیده
۶۵	۸۳/۱۱/۲۸	Cg40	نارنگی پیچ	رامسر	میوه رسیده
۶۶	۸۳/۱۰/۳۰	Cg71	دارابی	رامسر	برگ خشک
۶۷	۸۳/۱۱/۳۰	Cg57	دارابی	تنکابن	برگ خشک

* جدایه‌هایی که در آزمایش های شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی از آنها استفاده شده است.

تاریکی قرار گرفت. از کشت ۵-۳ روزی قارچ، حلقه‌های ۶-۴ میلی‌متری واجد میسلیوم تهیه و به محیط اختصاصی YPSS انتقال یافتند و در دمای ۲۱°C، در تناوب نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی داخل اینکوباتور به مدت ۳۰-۲۱ روز قرار گرفتند. محیط YPSS شامل ۴ گرم عصاره مخمر، ۱۵ گرم نشاسته، ۲۰ گرم آگار، ۱ گرم K_2HPO، ۰/۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$ و یک لیتر آب مقطر می‌باشد. ابتدا هر جدایه به تنهایی روی محیط YPSS کشت داده شد تا وضعیت هموتال بودن جدایه مشخص گردد. پس از طی شدن زمان لازم، جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و آنهایی که توانسته بودند به تنهایی پریتسیوم‌های بارور تولید کنند به عنوان هموتال محسوب و از ادامه آزمایش کنار گذاشته شدند. سایر جدایه با یکدیگر تلاقی داده شدند. تلاقی‌ها روی محیط YPSS انجام گرفت بدین صورت که حلقه‌های میسلیومی هر دو جدایه به ترتیب فوق به فاصله ۲-۱ سانتی‌متر از هم در تشتک‌های پتری ۹cm حاوی YPSS قرار داده شدند. کشت‌ها به شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۱°C به مدت ۳۰-۲۱ روز منتقل شدند. پس از طی شدن زمان لازم، بررسی‌ها انجام شد تا جدایه‌های هتروتال که در تلاقی‌ها پریتسیوم تولید کردند، مشخص شوند.

شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی

برای شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی، ۴۱ جدایه به طور تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱).

به دست آوردن جهش یافتگان *nit*

برای جدا کردن جهش یافتگان *nit*، از کشت‌های ۵-۳ روزی قارچ روی محیط غذایی PDA، حلقه‌های ۶-۴ میلی متری واجد میسلیوم تهیه شد و روی محیط واجد کلرات ۵٪ (MMC) کشت شدند. کشت هر جدایه روی محیط واجد کلرات با ۸ بار تکرار انجام شد و هر ۴ حلقه واجد میسلیوم در یک تشتک پتری ۹ سانتیمتری

با فاصله از هم قرار گرفتند. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵°C در تاریکی به مدت ۲۱-۱۵ روز قرار گرفتند. برای تهیه محیط کلرات به محیط Minimal Medium (MM)، ۵۰ گرم $KClO_3$ اضافه شد تا محیط واجد کلرات ۵٪ به دست آید. محیط MM شامل ۱۰ گرم دکستروز، ۱ گرم KH_2OPO_4، ۱ گرم K_2HPO_4، ۰/۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۱ گرم $CaCl_2.H_2O$، ۱۰ میلی‌لیتر محلول B-Complex vitamin، ۰/۲ میلی‌لیتر محلول trace element (۵ گرم اسید سیتریک، ۵ گرم $ZnSO_4.6H_2O$، ۱ گرم $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$، ۲۵۰ میلی‌گرم $CuSO_4.5H_2O$، ۵۰ میلی‌گرم $MnSO_4$، ۵۰ میلی‌گرم اسید بوریک، ۵۰ میلی‌گرم $Na_2MoO_4.2H_2O$ در ۹۵ میلی‌لیتر آب مقطر)، ۰/۲ میلی‌لیتر محلول $FeSO_4$ و ۲ گرم نیترات سدیم در ۱ لیتر آب مقطر می‌باشد. محلول B-Complex vitamin شامل ۶۰ میلی‌گرم تیامین، ۳۰۰ میلی‌گرم بیوتین، ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول خالص و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر است (Harp & Correll, 1998).

تعیین فنوتیپ جهش یافتگان *nit*

به منظور جدا کردن جهش یافتگان *nit*، جدایه‌هایی که روی محیط MMC قطاع‌های (میسلیوم‌های) سریع‌الرشد تولید کردند، انتخاب شدند. رشد قطاع‌های سریع الرشد به صورت غیرمتراکم و ضعیف با میسلیوم هوایی کم می‌باشد. در بین جدایه‌ها، دو جدایه نتوانستند روی محیط واجد کلرات رشد نمایند که به عنوان جدایه‌های وحشی شناسایی شدند و به کلرات مقاوم نمی‌باشند. برای این دو جدایه احتمالاً به دلیل این که در ژن سنتز آنزیم احیاکننده نیترات آنها نقص وجود نداشت، جهش یافته‌ای بدست نیامد و از ادامه آزمایش کنار گذاشته شدند. ۳۹ جدایه باقیمانده نوک هیف شده و به محیط MM منتقل شدند.

از هر جدایه ۱۲ نوک هیف به دست آمد. جدایه‌ها در محیط MM رشد ضعیف و غیرمتراکم که شاخص جهش یافته‌های *nit* است، نشان دادند. برای تعیین وجود فنوتیپ جهش یافته *nit* M در بین جدایه‌ها قطاع‌ها به محیط هیپوزانتین منتقل شدند. محیط هیپوزانتین شامل محیط MM است که به جای نیترات سدیم، در آن ۰/۲ گرم هیپوزانتین وجود دارد. کشت‌ها در دمای ۲۵°C در تاریکی قرار گرفتند. جدایه‌هایی که در محیط هیپوزانتین به صورت ضعیف با میسلیوم هوایی کم رشد کردند به عنوان *nit* M شناسایی شدند و سایر کشت‌ها با رشد وحشی به منظور جداسازی فنوتیپ جهش یافته‌های *nit* 1 و *nit* 3 به محیط نیتریت سدیم منتقل شدند. محیط نیتریت سدیم شامل محیط MM است که به جای نیترات سدیم در آن۰/۲ گرم نیتریت سدیم وجود دارد. اگر در محیط نیتریت سدیم کشت‌ها دارای رشد ضعیف بودند به عنوان *nit* 3 و در صورت رشد وحشی به عنوان *nit* 1 شناسایی شدند.

آزمایش‌های تکمیل ژنتیکی جهش یافتگان و شناسایی گروه‌های سازگار رویشی

به منظور گروه‌بندی جدایه‌ها ابتدا جهش‌یافتگان *nit* هر جدایه با هم روی محیط MM تلاقی داده شدند. بدین منظور در صورت وجود جهش یافتگان *nit* مختلف برای هر جدایه، تلاقی‌ها به صورت *nit* 1 × *nit* M، *nit* 1 × *nit* 3 و *nit* 3 × *nit* M انجام گرفت. جهش یافتگان هر جدایه که تولید هتروکاریون کردند به منظور آزمایشات تکمیلی انتخاب شدند. جهش یافتگان هر جدایه که نتوانستند هتروکاریون تشکیل دهند به عنوان خود ناسازگار رویشی (HSI) شناسایی شده و آن جدایه از ادامه آزمایش حذف شد. در بین جدایه‌ها دو جدایه به عنوان خود ناسازگار شناسایی شدند. جهش یافتگان *nit* سایر جدایه‌ها برای شناسایی گروه‌های سازگار رویشی روی محیط MM با هم تلاقی داده شدند. تلاقی‌ها در همه حالات ممکن به صورت *nit* 1× *nit* M، *nit* 1× *nit* 3 و *nit* 3×*nit* M انجام گرفت. تمامی تلاقی‌ها حداقل دو بار تکرار شدند و در دمای ۲۵°C در تاریکی قرار گرفتند.

نتایج

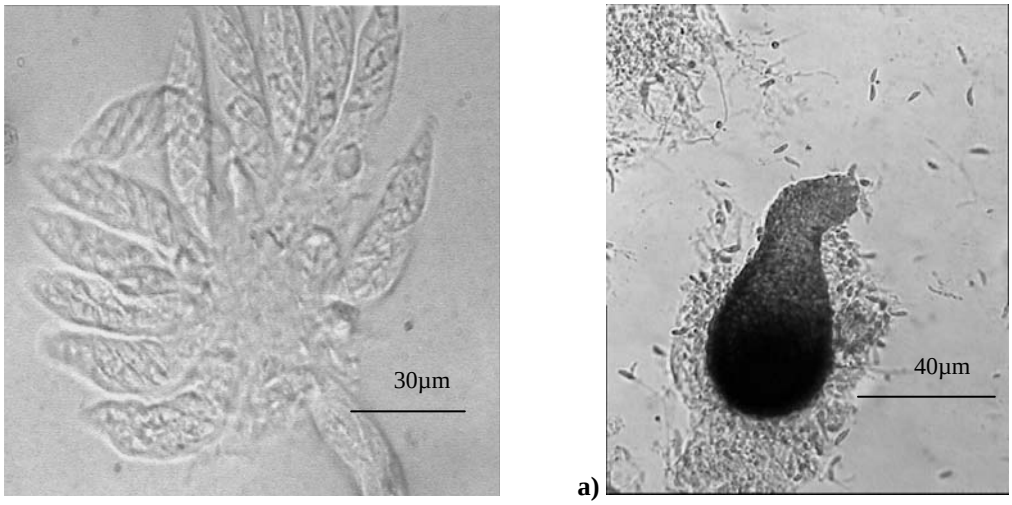
از بین ۶۷ جدایه که برای بررسی باروری جنسی مورد آزمایش قرار گرفتند، شش جدایه توانستند بدون تلاقی با سایر جدایه‌ها پریتسیوم بارور شامل آسک و آسکوسپور تشکیل دهند. این جدایه‌ها شامل Cg11، Cg16، Cg21، Cg27، Cg52 و Cg66 بودند که مشخصات آنها در جدول ۱ آمده است. این جدایه‌ها به عنوان جدایه‌های هموتال شناسایی شدند و فراوانی آنها در بین جدایه‌ها ۸/۸٪ بود. سایر جدایه‌ها به منظور

تعیین هتروتال بودن با یکدیگر تلاقی داده شدند. تنها برای ۱۲ تلاقی پریتسیوم بارور شامل آسک و آسکوسپور تولید گردید. تلاقی‌هایی که منتج به تولید پریتسیوم گردیدند به شرح زیر می‌باشند:

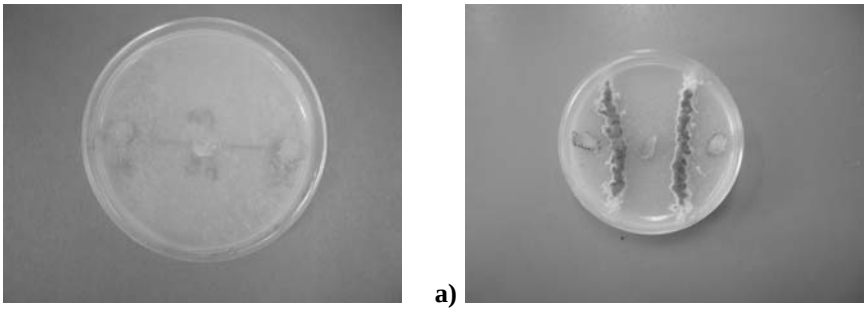
Cg22×Cg28
Cg34×Cg40
Cg8×Cg14
Cg35×Cg40
Cg33×Cg53
Cg22×Cg62
Cg22×Cg72
Cg46×Cg70
Cg33×Cg34
Cg5×Cg58
Cg37×Cg47
Cg35×Cg74

در تلاقی‌ها، پریتسیوم‌ها در محل برخورد میسلیوم دو جدایه تشکیل شدند. مرفولوژی پریتسیوم‌ها، آسک‌ها و آسکوسپورها در جدایه‌های هموتال و هتروتال با هم تفاوتی نداشتند. پریتسیوم‌ها گرد، دارای گردن بلند و دیواره ضخیم و صاف بودند و اندازه آنها ۵۰×۷۰ میکرومتر بود (شکل۱). آسک‌ها دسته جمعی و مجتمع داخل پریتسوم ها قرار داشتند و استوانه ای تا بیضوی شکل بودند و اندازه آنها ۱۰×۵۰ میکرومتر بود (شکل۱). آسکوسپورها به تعداد ۸ عدد داخل هر آسک قرار داشتند و تک سلولی و بی رنگ بودند و اندازه آنها ۵×۱۵ میکرومتر بود.

با بررسی ۴۱ جدایه برای شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی، دو جدایه Cg6 و Cg8 با عدم رشد روی محیط واجد کلرات ۵٪ به عنوان جدایه‌های وحشی شناسایی شدند و احتمالا به علت نداشتن جهش در ژن سنتز آنزیم احیا کننده نیترات از ادامه آزمایش حذف شدند. در بین جهش یافتگان همه جدایه‌ها *nit* 1 با فراوانی ۶۶٪، *nit* 3 با فراوانی ۵۶٪ و *nit* M با فراوانی ۵۳٪ به دست آمدند. تلاقی‌های درون جدایه‌ای به منظور جدا کردن جدایه‌های خود ناسازگار رویشی نشان داد که دو جدایه Cg63 و Cg64 خودناسازگار رویشی می‌باشند. این جدایه‌ها از ادامه آزمایش کنار گذاشته شدند تا برای تعیین گروه‌ها سازگار رویشی خطا صورت نگیرد. در ادامه، با تلاقی جهش یافتگان *nit* جدایه‌ها با یکدیگر، تلاقی‌های چهار جدایه توانستند هتروکاریون پایدار تشکیل دهند. دو جدایه Cg24 و Cg14 با یکدیگر و دو جدایه Cg43 وCg56 با هم هتروکاریون تشکیل دادند. نامگذاری گروههای سازگاری رویشی به صورت VCG1,VCG2, ... انجام شد. سایر جدایه‌ها نتوانستند در تلاقی‌ها هتروکاریون تشکیل دهند ولی با این وجود نامگذاری شدند. بنابراین، سی و پنج VCG به دست آمد. VCG1 شامل Cg24 و Cg14 و VCG2 شامل Cg43 و Cg56 بودند. بقیه گروه‌ها تک عضوی بودند.



شکل۱- مرفولوژی اندام‌های تکثیر جنسی در *Glomerella cingulata* Cg16 a) پریتسیوم b) رسته آسک‌ها



شکل۲- تلاقی جهش یافتگان *nit* قارچ *Glomerella cingulata* برای شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی. a) تشکیل هتروکاریون و رشد تیپ وحشی در محل تلاقی هیف‌های دو جهش یافته M *nit* جدایه Cg56 و جهش یافته 3 *nit*. جدایه Cg43. b) عدم تشکیل هتروکاریون بین جهش یافته M *nit* جدایه Cg12 و جهش یافته 1 *nit* جدایه Cg30.

بحث

سازگاری جنسی در قارچ‌های رشته‌ای آسکومیست برای اولین بار توسط Edgerton (1914) بررسی شد. قارچ *G. cingulata* از قارچ هایی می‌باشد که هم دارای جدایه‌های هموتال و هم دارای جدایه‌های هتروتال می‌باشد و حدس زده می‌شود که جدایه‌های هتروتال در اثر جهش که روی ژن‌های جدایه‌های هموتال اتفاق می‌افتد به دست آمده باشند (Wheeler, 1956). تشکیل فرم جنسی برای این گونه به ندرت اتفاق می‌افتد و بیان می‌شود که عدم تولید پریتسیوم می‌تواند به علت ناتوانی جدایه‌ها در تولیدمثل جنسی باشد (TeBeest, 1982). در این مطالعه ۸/۸٪ از جدایه‌ها هموتال و ۲۵٪ از جدایه‌ها هتروتال بودند که این نتایج وجود جدایه‌های هموتال و هتروتال را در جمعیت قارچ تأیید می‌کند. این نتیجه توسط Viallancourt & Hanau (1991) نیز به دست آمده بود. Guerra *et al.* (2005) جدایه‌های *G. lindemuthianum* را بررسی کرده و بین ۱۹ جدایه تمامی تلاقی‌های ممکن را انجام دادند و فقط یک پریتسیوم بارور به دست آمد. چنین نتیجه‌ای برای *G. graminicola* توسط Viallancourt & Hanau (1991) نیز بیان شده است. قارچ *G. cingulata* برای تولید مثل جنسی تحت تاثیر محیط کشت و شرایط آب و هوایی قرار دارد ولی بعضی جدایه‌ها به صورت ذاتی قادر به تشکیل پریتسیوم نمی‌باشند (Mamandhar *et al.*, 1986). می‌توان فراوانی پایین باروری جنسی را در این مطالعه به علت بیان شده دانست. در این مطالعه جدایه‌های هموتال جدایه‌هایی می‌باشند که از مناطق مختلف و از شاخه و ناحیه ریزش میوه روی میزبان‌های مختلف مرکبات به دست آمده بودند که این موضوع پراکنش ژنتیکی قارچ را از نظر هموتال بودن نشان می‌دهد. جدایه‌های هتروتال نیز دارای پراکنش از نظر میزبان و محل جمع‌آوری می‌باشند. در جدایه‌های هتروتال می‌توان بیان کرد چهار جدایه Cg47، Cg74، Cg33 و Cg40 دارای تیپ آمیزشی یکسان می‌باشند. زیرا جدایه Cg40 با دو جدایه Cg34 و Cg35 تلاقی پیدا کرد و این دو جدایه در تلاقی‌های جداگانه به ترتیب با جدایه‌های Cg33 و Cg74 تلاقی یافته و تولید پریتسیوم کردند. همچنین با جدایه Cg74 تلاقی پیدا کرد و تولید پریتسیوم کرد. همچنین جدایه‌های Cg37، Cg34 و Cg35 هم می‌توانند تیپ آمیزشی یکسان داشته باشند.

ناسازگاری رویشی در برخی قارچ‌ها مثل بازیدیومیست‌ها توسط ژن‌های تعیین‌کننده تیپ آمیزشی کنترل می‌شود در صورتی که در اغلب قارچ‌های آسکومیست با لوکوس‌های *vic* کنترل می‌شود و فقط جدایه‌هایی که دارای آلل یکسان در تمام لوکوس‌ها باشند قادر به تشکیل هتروکاریون پایدار هستند که در صورت ایجاد هتروکاریون پایدار، دو جدایه در یک گروه سازگاری قرار می‌گیرند (Mamandhar *et al.*, 1986). جهش‌یافتگان *nit* در محیط حاوی کلرات انتخاب می‌شوند که دارای نقص ژنتیکی برای تولید آنزیم احیاکننده نیترات هستند و به صورت قطاع‌های سریع‌الرشد به دست می‌آیند. سه گروه فنوتیپی با نام‌های 1 *nit* (یک جهش در جایگاه ژنی ساختمانی آنزیم احیاکننده نیترات)، 3 *nit* (یک جهش در جایگاه ژنی تنظیمی اختصاصی مسیر مصرف نیترات) و بالاخره M *nit* (حداقل یک جهش در جایگاه‌های ژنی موثر در

ساخت کوفاکتور دارای مولیبدن که برای فعالیت آنزیم احیاکننده نیترات لازم است) از جهش یافتگان به دست می‌آید (Leslie, 1993). گروه‌بندی VCG برای تعیین نژادهای جدید در منطقه، مشخص کردن تخصص میزبانی و همچنین تعیین گروه‌های بیماری‌زایی مفید می‌باشد و افزایش گروه‌های VCG بیانگر افزایش تنوع ژنتیکی می‌باشد (Glass & Gretchen, 1992).

Brooker *et al.* (1990) جدایه‌های مختلف جنس را برای تعیین گروه‌های سازگاری رویشی مورد مطالعه قرار دادند و بیشترین درصد به دست آمده در مورد *nit* 1 وجود داشت که این نتیجه در آزمایش ما نیز تأیید شد.

Abang *et al.* (2004) جدایه‌هایی را از گیاه کاساوا جدا کردند و ۲۸ گروه سازگاری رویشی از ۴۱ جدایه به دست آمد و بیان کردند که حتی نمونه‌هایی که از یک محل به دست آمده بودند گاهی در گروه‌های جداگانه قرار گرفتند. نتایج حاصل از این مطالعه نیز نشان می‌دهد که تنها دو گروه دو عضوی وجود دارد و سایر جدایه‌ها نتوانستند گروهی تشکیل دهند زیرا با سایر جدایه‌ها هتروکاریون تشکیل ندادند.

VCG1 و VCG2 شامل جدایه‌هایی بودند که از شاخه جدا شده بودند که این نتیجه بیانگر آن است که جدایه‌هایی که از یک قسمت درخت جمع‌آوری شدند شباهت ژنتیکی بیشتری را دارا هستند. به دلیل این که سایر جدایه‌ها که نتوانستند گروهی تشکیل دهند می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های به دست آمده از مرکبات استان مازندران زیاد می‌باشد. عوامل ایجادکننده تنوع می‌توانند جهش و تولیدمثل‌جنسی باشند. وجود تولیدمثل جنسی در این مطالعه اثبات شد که می‌تواند ایجاد کننده تنوع باشد. دوره رشد طولانی مرکبات باعث می‌شود که ماندگاری قارچ روی میزبان طولانی باشد و فرصت لازم برای تغییرات ژنتیکی از طریق جهش وجود داشته باشد. ماندگاری میزبان از جمله عواملی است که می‌تواند در فراهم کردن محیط مناسب برای قارچ نقشی را در ایجاد تنوع قارچ داشته باشد (Kelemu *et al.*, 1999).

سپاسگزاری

از حمایت‌های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران برای فراهم کردن بودجه لازم برای انجام این تحقیق از محل اعتبارات ویژه قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Abang, M. M., Hoffmann, P., Winter, S., Green, K. R. & Wolf, G. A. (2004). Vegetative Compatibility among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from Yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. *Journal of Phytopathology*, 152, 21-27.
2. Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology* (5th ed). Elsevier Academic Press, Florida.
3. Atkinson, G. F. (1892). A new anthracnose of privet. *Bulletin of the Cornell University Experimental Station*, 49, 309-314.
4. Brooker, N. L., Leslie, J. F. & Dickman, M. B. (1990). Nitrate non-utilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. *Phytopathology*, 81, 672-677.
5. Correll, J. C., Guerber, J. C., Wasilwa, L. A., Sherriff, J. F. & Morelock, T. E. (2000). Inter- and intraspecies variation in *Colletotrichum* and mechanisms which affect population structure. In Purusky, D., Freeman, S. & Dickman, M. B. (Eds), *Colletotrichum: host Specificity, pathology, and host-Pathogen interaction*. (pp. 145-179). APS Press, Minnesota.
6. Du, M., Schardi, C., Nuckles, E. & Villancourt, L. (2005). Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. *Mycologia*, 97, 641-658.
7. Edgerton, C. W. (1914). Plus and minus strains in the genus *Glomerella. Mycologia*, 47, 311-316.
8. Glass, N. L. & Gretchen, A. K. (1992). Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 201-224.
9. Guerra, R., Ramírez, M. T., Enciso, M., Serrano, M., Maldonado, Z., Chavira, M. & Simpson, J. (2005). Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. *Mycologia*, 97, 793-803.
10. Harp, T. L. & Correll, J. C. (1998). Recovery and characterization of spontaneous, selenate-resistant mutants of *Magnaporthe grisea*, the rice blast pathogen. *Mycologia*, 90, 954-963.
11. Hibbett, D. & Binder, J. F., Bischoof, M., ... (2007). A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research*, 111, 509-547.

12. Kelemu, S., Skinner, D. Z., Badle, J. L., Moreno, C. X., Radrigues, M. X., Fernandes, C. D., Charchar, M. J. & Chakraborty, S. (1999). Genetic diversity in South American *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from *Stylosanthes guianensis* a tropical forage legume. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 261-272.
13. Leslie, J. F. (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 127-5150.
14. Mamandhar, J. B., Hartman, G. L. & Sinclair, J. (1986). *Colletotrichum destructirum*, the anamorph of *Glomerella glycines*. *Phytopathology*, 76, 282-285.
15. TeBeest, D. O. (1982). Survival of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* in rice irrigation water and soil. *Plant Disease*, 66, 469-472.
16. Viallancourt, L. J. & Hanau, R. M. (1991). A method for analysis of *Glomerella graminicola* from maize. *Phytopathology*, 81, 530-534.
17. Wheeler, H. E. (1956). Genetic and evolution of heterothallism in *Glomerella*. *Phytopathology*, 44, 342-345.