Iranian Journal of Plant Protection Science
Vol 48, No 2, Autumn & Winter 2017-2018 (295-305)
DOI: 10.22059/ijpps.2018.65560

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۶ (ص ۳۰۵-۲۹۵)

شناسایی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی در قارچ *Paecilomyces formosus*، عامل بیماری خشکیدگی سرشاخه درختان پسته و برخی میزبان‌های دیگر و بررسی امکان تولید مثل جنسی آن در شرایط آزمایشگاهی

رضا حیدریان[۱]، خلیل بردی فتوحی فر[۲*]، امیرحسین محمدی[۳] و محمد جوان نیکخواه[۴]
۱، ۲ و ٤. دانشجوی دکتری رشته بیماری شناسی گیاهی، دانشیار و استاد، گروه گیاه پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، کرج
۳. استادیار، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده پسته، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۱)

چکیده

بیماری خشکیدگی سرشاخه‌های درختان پسته یک بیماری مهم در مناطق پسته‌کاری ایران محسوب می‌گردد. یکی از مهم‌ترین عوامل قارچی این بیماری، از جنس *Paecilomyces* است که اخیراً بر اساس مطالعات فیزیولوژیکی و فیلوژنتیکی در گونه *P. formosus* قرار گرفته است. در این پژوهش با استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی شناخته‌شده در گونه *P. variotii* موجود در بانک ژن (NCBI)، تعداد چهار جفت آغازگر طراحی شدند و در تعدادی از جدایه‌های قارچ *P. formosus* آزمایش گردیدند و درنهایت یک جفت آغازگر شامل Mat1-1f224 و Mat1-1r224 برای تکثیر Mat1-1 و یک جفت آغازگر به نام‌های Mat1-2f165 و Mat1-2r165 برای تکثیر Mat1-2 انتخاب شدند. ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی در ۱۲٤ جدایه از گونه *P. formosus* که از درخت پسته و هشت گونه دیگر شامل بنه، انار، بادام اهلی، ابریشم مصری، خرزهره، درخت گز، درختچه شوره گز، درخت تاغ و هوای باغات پسته به دست آمده بودند، نیز تکثیر شدند. درنتیجه در ۵۰ جدایه (٤۰/۳ درصد) Mat1-1، در ۵۹ جدایه (٤۷/٦ درصد) Mat1-2 و در ۱۵ جدایه (۱۲/۱ درصد) نیز هر دو ایدیومورف تیپ آمیزشی تکثیر شدند. تعداد ۱٦ جدایه از هر تیپ آمیزشی و سه جدایه که دارای هر دو ایدیومورف بودند، انتخاب شدند و روی محیط کشت PDA با حالات مختلف باهم تلاقی داده شده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مداوم نگهداری شدند. پس از گذشت هشت ماه، هیچ نشانه‌ای مبنی بر وقوع تولیدمثل جنسی مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: تلاقی، توالی، Mat، آغازگر، *P. variotii*.

Identification of mating type idiomorphs in *Paecilomyces formosus*, the causal agent of die-back disease in pistachio and some other hosts and investigation on the possibility of in vitro sexual reproduction

Reza Heidarian[1], Khalil-Berdi Fotouhifar[2*], Amir Hossein Mohammadi[3] and Mohammad Javan-Nikkhah[4]
1, 2, 4. Ph. D. Candidate, Associate Professor and Professor, Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Assistant Professor, Horticultural Science Research Institute, Pistachio Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran
(Received: May 28, 2016- Accepted: Nov. 21, 2016)

ABSTRACT

Pistachio die-back disease is an important disease in Iranian pistachio orchards. One of the most important fungal agents of the disease is *Paecilomyces* which has been recently identified as *P. formosus* based on phylogenetic and physiologic studies. In this study, four pairs of primers designed using mating type idiomorph sequences of *P. variotii* deposited in GenBank (NCBI). Designed primers were tested in some isolates of *P. formosus* and finally two primer pairs including; Mat1-1f224 and Mat1-1r224 for amplification of Mat1-1 and Mat1-2f165 and Mat1-2r165 primers for amplification of Mat1-2 idiomorphs were selected. Mating type idiomorphs were amplified in 124 isolates of *P. formosus* which have been obtained from pistachio trees and eight other species including; *Pistacia mutica*, *Punica granatum*, *Prunus amygdalus*, *Caesalpinia gilliesii*, *Nerium oleander*, *Tamarix aphylla*, *Tamarix hispida*, *Haloxylon* sp. and air of pistachio orchards. In 50 isolates (40.3%) Mat1-1, in 59 isolates (47.6%) Mat1-2 and in 15 isolates (12.1%) both idiomorphs were identified. 16 isolates from each mating type and three isolates which had both idiomorphs were selected and crossed in all of the possible combinations on PDA culture medium and cultures were incubated at 25 °C in continuous dark condition. After eight months, sexual reproduction was not observed in crosses.

Keywords: Crossing, Mat, *P. variotii*, primer, sequence.

* Corresponding author E-mail: fotowhi@ut.ac.ir

مقدمه

ایران یکی از مهم‌ترین کشورهای تولیدکننده پسته در دنیا است. سطح زیر کشت پسته در ایران نزدیک به ۵۰۰ هزار هکتار بوده و تولید سالانه پسته در ایران بیش از ۲۰۰ هزار تن است. این محصول در بسیاری از استان‌های کشور تولید می‌شود؛ اما استان‌های کرمان، یزد، خراسان جنوبی، خراسان رضوی، سمنان، مرکزی، اصفهان، قم و تهران دارای بیشترین سطح زیر کشت پسته هستند (www.Iranpistachio.org, 2014).

بیماری خشکیدگی سرشاخه‌های درختان پسته یک بیماری مهم در تمامی مناطق پسته‌کاری ایران محسوب می‌گردد و اکثر ارقام پسته که در شرایط نامطلوب رشد می‌کنند، به آن مبتلا می‌گردند. به‌طور کلی این بیماری در طی سال‌هایی که شرایط آب و هوایی و همچنین شرایط محیطی برای رشد درختان پسته نامناسب باشد، از شدت بیشتری برخوردار است (Haghdel, 2008). میزان آلودگی درختان پسته به این بیماری، در مناطق رفسنجان، کرمان، یزد و خراسان بین صفر تا ۹۰ درصد و به‌طور متوسط ۱۵ درصد تخمین زده شده است (Ashkan *et al*., 1997; Mozafari *et al*., 2006). تغییر در بعضی عوامل محیطی مانند کاهش شدید کیفیت آب آبیاری، تشدید اثرات خشکسالی، کاهش مقدار آب لازم جهت آبشویی باغ‌ها و عدم تعادل عناصر غذایی در خاک، درختان را در مقابل این بیماری ضعیف نموده و باعث افزایش شدت این بیماری می‌شود (Haghdel, 2008; Mohammadi & Haghdel, 2006).

یکی از مهم‌ترین عوامل قارچی این بیماری در درختان پسته، از جنس *Paecilomyces* است (Alizadeh *et al*., 2000; Heidarian *et al*., 2015). عامل این بیماری بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی، قارچ *Paecilomyces variotii* معرفی شده بود (Samson, 1974; Aminaei & Ershad, 1989; Alizadeh *et al*., 2000; Ebrahimi, 2012; Ershad, 2009; Ghelichi *et al*., 2012) اما با استفاده از تاکسونومی چندوجهی (polyphasic) بر مبنای ویژگی‌های ریخت‌شناختی، فیزیولوژیکی و فیلوژنی مولکولی، نام درست عامل این بیماری در درخت پسته و هشت گونه دیگر از درختان موجود در مناطق پسته‌کاری ایران، قارچ *Paecilomyces formosus* معرفی شده‌است (Heidarian *et al*., 2015a; Heidarian *et al*., 2015b).

سابقه تولیدمثل جنسی، به‌اندازه قدمت پیدایش یوکاریوت‌ها در طبیعت یا اندکی کمتر از آن است. تولیدمثل جنسی باعث نوترکیبی ژنتیکی در موجودات یوکاریوت می‌شود (Ni *et al*., 2011). نوترکیبی میوتیک ناشی از تولیدمثل جنسی در قارچ‌ها، در مواردی باعث توسعه مقاومت قارچ به قارچ‌کش‌ها (Heitman *et al*., 2013)، تغییر در قدرت بیماری‌زایی، غلبه بر مقاومت گیاه میزبان (Burdon & Thrall, 2009) و حتی توسعه مقاومت شیمیایی در مقابل بندپایان قارچ‌خوار (Doll *et al*., 2013) می‌شود.

تاکنون تولیدمثل جنسی قارچ *P. formosus* در دنیا گزارش نشده است (Samson *et al*., 2009)؛ اما در گونه *P. variotii* که نزدیک‌ترین خویشاوند گونه *P. formosus* است، تولیدمثل جنسی گزارش شده است. جدایه‌های مقاوم به حرارت از قارچ *P. variotii* که از تیپ آمیزشی سازگار باهم باشند، به شیوه کشت روی محیط کشت جامد PDA قابل تلاقی هستند. پس از تلاقی و نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مطلق به مدت شش تا نه هفته، آسکوکارپ، آسک و آسکوسپور تولید می‌شود. تلئومورف این قارچ *Byssochlamys spectabilis* است (Houbraken *et al*., 2008). جنس *Byssochlamys* دارای نه گونه است که پنج گونه شامل *B. fulva*، *B. laguncularia*، *B. nivea*، *B. spectabilis* و *B. zollerniae* دارای تلئومورف مشخص هستند. گونه *P. divaricatus* روی محیط کشت مصنوعی فقط مراحل اولیه تشکیل آسکوکارپ تا مرحله ایجاد کروزیر (crozier) را تولید می‌نماید و در سه گونه شامل *P. brunneolus*، *P. formosus* و *P. dactylethromorphus* تولیدمثل جنسی دیده نشده است، ولی بر اساس تجزیه‌وتحلیل‌های فیلوژنتیکی در کلاد *Byssochlamys* قرار گرفته‌اند (Samson *et al*., 2009; Luangsa-ard & Hywel-Jones, 2004).

تولیدمثل جنسی در آسکومیست‌های رشته‌ای با دو ایدیومورف Mat1-1 و Mat1-2 کنترل می‌شود که هر

یک شامل یک تا سه ژن هستند. در گونه *B. spectabilis* (*P. variotii*) ایدیومورف‌های MAT1-1 و MAT1-2 با استفاده از آغازگرهای دژنره (degenerate primers) قابل تکثیر هستند. از تکثیر MAT1-1 یک قطعه به اندازه ۳۳۴ جفت نوکلئوتیدی و از تکثیر MAT1-2 یک قطعه به اندازه ۱۸۸ جفت نوکلئوتیدی تولید می‌شود و پراکنش این دو ایدیومورف در جدایه‌های قارچ *P. variotii* به نسبت یک‌به‌یک است. از تلاقی جدایه‌های تک آسکوسپوری حاصل از نسل اول با جدایه‌های آزمایشگر نیز تولیدمثل جنسی رخ می‌دهد و ایدیومورف‌های MAT1-1 و MAT1-2 به نسبت مساوی در نتاج وجود دارند. جدایه‌های مورد آزمایش فقط متعلق به یک گونه بیولوژیکی هستند (Houbraken *et al.*, 2006; Houbraken *et al.*, 2008).

Jamali & Banihashemi (2011) گونه *B. spectabilis* را به‌عنوان فرم جنسی گونه *P. variotii* برای اولین بار از ایران گزارش کردند.

با توجه به اهمیت و گستردگی این بیماری در ایران و با توجه به اینکه مشاهده تولیدمثل جنسی قارچ می‌تواند کمک بسیار زیادی در شناسایی و فیلوژنی قارچ نماید و نیز بخشی از بیولوژی قارچ را روشن می‌نماید که خود نمادی از نحوه دوام و تکثیر و انتقال عامل بیماری است و علاوه بر آن بیانگر وقوع نوترکیبی میوتیک در قارچ است که در بروز مقاومت به قارچ‌کش‌ها، تغییر در قدرت بیماری‌زایی، ایجاد نژادهای فیزیولوژیک جدید و غلبه بر مقاومت میزبان مؤثر می‌باشد، بررسی امکان تولیدمثل جنسی این قارچ، ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این پژوهش، طراحی آغازگرهای جدید برای تکثیر ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی در گونه *P. formosus*، تکثیر و ردیابی ایدیومورف‌ها در جمعیت بیمارگر، بررسی امکان باروری جنسی این‌گونه در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از تلاقی جدایه‌ها و شناسایی گونه‌های بیولوژیکی این بیمارگر است.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌ها

برای این پژوهش از جدایه‌های قارچ *P. formosus* که در تحقیق Heidarian *et al.* (2015 a, b) به دست آمده و برای تاکسونومی چندوجهی و شناسایی دقیق عامل بیماری مورد بررسی قرار گرفته بودند، استفاده شد. این جدایه‌ها در طی سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ از شاخه‌ها و سرشاخه‌های درختان پسته (*Pistacia vera*) در مناطق مهم پسته‌کاری ایران که علائم خشکیدگی شاخه و شانکر را نشان می‌دادند و از سایر درختان مثمر و غیرمثمر موجود در این مناطق نیز که علائم خشکیدگی سرشاخه یا شانکر را نشان می‌دادند، به‌دست آمده‌بودند. نمونه‌های آلوده گیاهی از استان‌های کرمان، سمنان، خراسان جنوبی، خراسان رضوی، اصفهان، مرکزی، قزوین، تهران و یزد که بیشترین سطح زیر کشت پسته ایران را به خود اختصاص داده‌اند، توسط نگارنده اول جمع آوری شده‌اند. تعدادی جدایه نیز از هوای باغات آلوده پسته به‌دست آمده‌بودند. تعداد ۱۲۴ جدایه از گونه *P. formosus* که از درخت پسته و هشت گونه دیگر شامل بنه (*Pistacia mutica*)، انار (*Punica granatum*)، بادام اهلی (*Prunus amygdalus*)، ابریشم مصری (*Caesalpinia gilliesii*)، خرزهره (*Nerium oleander*)، درخت گز (*Tamarix aphylla*)، درختچه شوره گز (*Tamarix hispida*)، درخت تاغ (*Haloxylon* sp.) و هوای باغات پسته به دست آمده بودند بر مبنای بیشترین پراکنش جغرافیایی از استان‌ها و شهرستان‌های مختلف و نیز مناطق آب و هوایی متفاوت (جدول ۲) انتخاب شدند. در مورد جدایه‌های به‌دست آمده از درختان پسته، جدایه‌هایی از ارقام مختلف پسته شامل احمدآقایی، فندقی، کله قوچی، اکبری، بادامی، شاهپسند، عباسعلی، خنجری و برخی درختانی که بدون انجام پیوند به سن باروری رسیده بودند، گزینش شدند.

طراحی آغازگرها

برای طراحی آغازگرهایی که بتوانند ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی (Mat idiomorphs) قارچ عامل بیماری را مشخص نمایند، از توالی‌های mat1-1 و mat1-2 متعلق به قارچ *P. variotii* (Houbraken *et al.*, 2008) که در بانک ژن (NCBI) ذخیره شده بودند (با شماره دسترسی EU037085 برای mat1-1 و

EU037067 برای mat1-2)، استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار Primer3web (Untergasser *et al*., 2012) به آدرس اینترنتی Primer3.ut.ee اقدام به طراحی آغازگر شد و از بین آغازگرهای پیشنهادی، امکان ایجاد پرایمر - دایمر (primer-dimer) و حالت سنجاق سری (hairpin) نیز در نرم‌افزار Oligo Analyzer 3.1 (Offerman & Rychlik, 2003) به آدرس eu.idtdna.com بررسی گردید. نهایتاً دو جفت آغازگر (جدول ۱) برای هریک از قطعات انتخاب و توسط شرکت یوروفینس (Eurofins) کشور آلمان ساخته شدند. نام‌گذاری آغازگرها دارای چند قسمت است که نشان‌دهنده قطعه هدف و عملکرد به‌عنوان تکثیر روبه‌جلو[1] و معکوس[2] است.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی جدایه‌های *P. formosus*

Table 1. Designed primers for amplification of mating type idiomorphs in *P. formosus* isolates

Sequence (5′→3′)	جهت تکثیر	Primer
5'-TGGAAGAGTTGCTCCGCTAT-3'	F	mat1-1f181
5'-GGTCTCAACTTCCCTTCACG-3'	R	mat1-1r181
5'-GGAAGAGTTGCTCCGCTATC-3'	F	mat1-1f224
5'-GGTCTCAACTTCCCTTCACG-3'	R	mat1-1r224
5'-TATTGTCAAAGCAGCGCATC-3'	F	mat1-2f188
5'-TGCTTGCGTTTTATCTGCTC-3'	R	mat1-2r188
5'-GCATCCCGAGTTTCATAACAA-3'	F	mat1-2f165
5'-TGCTTGCGTTTTATCTGCTC-3'	R	mat1-2r165

آزمایش و انتخاب آغازگرها

ژنوم ۱۰ جدایه به‌وسیله هر چهار جفت آغازگر آزمایش شدند. برای این منظور مخلوط واکنش به ازای هر واکنش به این شکل تهیه شد: ۱X بافر Taq، ۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مول از هر یک از dNTPs، ۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرها، یک واحد از *Taq* DNA polymerase و ۵۰ نانوگرم از DNA الگو. حجم هر مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد.

برنامه حرارتی طبق آزمون‌های انجام شده به این صورت تنظیم گردید: واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه تکثیر (واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، همسرشته‌سازی در دمای ۵۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه)، بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه و نهایتاً محصول در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد.

از بین چهار جفت آغازگر طراحی شده، دو جفت آغازگر mat1-1.224 و mat1-2.165 که باندهای قوی‌تری ایجاد می‌کردند، پرایمر-دایمر تولید نمی‌کردند و از نظر اندازه محصول نیز باهم اختلاف بیشتری داشتند برای انجام آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند. هدف از انتخاب دو جفت آغازگر با اختلاف اندازه محصول این بود که بتوان این دو جفت آغازگر را به‌صورت توأم و در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندتایی (multiplex PCR) برای تکثیر هر دو ایدیومورف به‌طور هم‌زمان به کار برد تا زمان انجام و تعداد واکنش‌ها به نصف کاهش یابد.

ردیابی و تکثیر ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی در جمعیت قارچ

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ۱۲۴ جدایه با استفاده از این دو جفت آغازگر انجام شد و محصول واکنش از ژل آگارز یک درصد عبور داده شده و مورد بررسی قرار گرفت.

توالی‌یابی ایدیومورف‌ها و بررسی شباهت آنها با ایدیومورف‌های گونه *P. variotii*

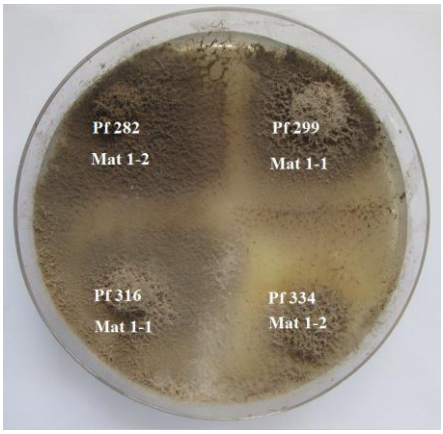
ایدیومورف سه جدایه از تیپ آمیزشی mat1-1 و سه جدایه از تیپ آمیزشی mat1-2 توسط شرکت یوروفینس آلمان (Eurofins Company, Ebersberg, Germany) توالی‌یابی شدند. برای این امر جدایه‌هایی انتخاب شدند که باند قوی‌تری ایجاد کرده‌بودند. پس از دریافت توالی‌ها از شرکت یوروفینس، کیفیت آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار کروماس‌پرو (Chromas Pro) (version 1.7.6, Technelysium, Australia) (McCarthy, 1996) بررسی شد. بخش‌های ابتدایی و انتهایی توالی‌ها که از اعتبار کافی برخوردار نبودند، حذف

1. Forward
2. Reverse

شدند (به‌طور میانگین ۱۱ نوکلئوتید). اشتباهات احتمالی که در حین تبدیل کروماتوگرام به نماد نوکلئوتید اتفاق افتاده بود، اصلاح گردید. با توجه به اینکه قبلاً گونه‌های *P. formosus* و *P. variotii* در یک گونه مرکب رده‌بندی می‌شده‌اند، شباهت‌های ریخت‌شناختی زیادی هم با یکدیگر دارند، آغازگرهای این پژوهش بر مبنای توالی‌های ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی گونه *P. variotii* طراحی شده‌اند و تولیدمثل جنسی در گونه *P. variotii* در دنیا و ایران گزارش شده است. میزان شباهت توالی‌های ایدیومورف‌های جدایه‌های مورد آزمایش، با ایدیومورف‌های متناظر از گونه *P. variotii* در وبگاه بانک ژن (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) و توسط نرم‌افزار Blast Nucleotides Sequence (Altschul *et al*., 1990) بررسی شد تا بتوان این بخش از اطلاعات مربوط به تولیدمثل جنسی را بین دو گونه باهم مقایسه کرد.

تلاقی بین جدایه‌هایی از تیپ‌های آمیزشی مختلف

تعداد ۱۶ جدایه از mat1-1، ۱۶ جدایه از mat1-2 و سه جدایه که دارای هردو ایدیومورف تیپ آمیزشی بودند بر مبنای بیشترین تنوع از نظر پراکنش جغرافیایی محل‌هایی که جدایه‌ها از آن به دست آمده بودند، نوع گونه و رقم میزبان و قوی‌تر بودن باندهای ایجادشده در ژل آگارز انتخاب شدند و روی محیط کشت PDA (Houbraken *et al*., 2010) با حالات مختلف باهم تلاقی داده شدند. به این صورت که در هر تشتک پتری دو جدایه از یک گروه آمیزشی با دو جدایه دیگر از گروه آمیزشی دوم به‌طور یک‌درمیان روی محیط کشت قرار داده شدند (شکل ۱). تشتک‌های پتری از نوعی انتخاب شدند که ارتفاع آن‌ها زیاد باشد و حجم زیادی از محیط کشت را در خود جای دهند، علاوه بر آن، درب تشتک‌های پتری نیز با دو لایه پارافیلم مسدود شدند تا در طی زمان، محیط کشت خشک شوند. برای هر تلاقی سه تکرار در نظر گرفته شد، سپس تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی مداوم به مدت هشت ماه نگهداری شدند. هرچند که Houbraken *et al.* (2010) پس از مدت شش تا نه هفته موفق به مشاهده تولیدمثل جنسی در گونه *P. variotii* شده بودند. تلاقی‌ها هر ماه یک‌بار از نظر امکان وقوع تولیدمثل جنسی بررسی شدند.



شکل ۱. تلاقی جدایه‌هایی از تیپ‌های آمیزشی مختلف جهت بررسی امکان تولیدمثل جنسی، هشت ماه پس از تلاقی روی محیط کشت PDA

Figure 1. Crosses between isolates from different mating types, eight months after crossing on PDA

نتایج

آزمایش و انتخاب آغازگرها

دو جفت آغازگر mat1-1.224 و mat1-2.165 که برای ردیابی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی در جدایه‌ها انتخاب شدند. در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندتایی (multiplex PCR) برای تکثیر هر دو ایدیومورف به‌طور هم‌زمان به کار برده شدند اما به دلیل اینکه در محصول عبور داده شده از ژل آگارز یک درصد باند پرایمر-دایمر خیلی قوی‌تر می‌شد و در بعضی جدایه‌ها که هر دو ایدیومورف را داشتند باندهای ضعیفی شکل می‌گرفت از انجام این واکنش صرف‌نظر شد و دو آغازگر گزینش شده، برای ژنوم هر جدایه، در دو واکنش PCR جداگانه استفاده شدند.

ردیابی و تکثیر ایدیومورف‌ها در جمعیت قارچ

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژنوم تعداد ۱۲۴ جدایه با استفاده از دو جفت آغازگر mat1-1.224 و mat1-2.165 انجام شد. درنتیجه در ۵۰ جدایه (۴۰/۳ درصد) مورد بررسی ایدیومورف Mat1-1، در ۵۹ جدایه (۴۷/۶ درصد) ایدیومورف Mat1-2 (شکل ۲) و در تعداد ۱۵ جدایه (۱۲/۱ درصد) هر دو ایدیومورف

تیپ آمیزشی تکثیر شدند (جدول ۲). پراکنش ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی بین استان‌های مختلف تفاوتی نداشت. در پراکنش ایدیومورف‌ها بین میزبان‌های مختلف یک مورد قابل‌توجه وجود دارد که از ۱۵ جدایه دارای هر دو ایدیومورف، ۱۴ جدایه از درختان پسته و یک جدایه از درخت انار جداسازی شده‌اند. در سایر موارد بین پراکنش ایدیومورف‌ها و نوع میزبان ارتباطی مشاهده نشد.

جدول ۲. خصوصیات جدایه‌های مورد بررسی و نتیجهٔ شناسایی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی آن‌ها.

Table 2. Tested isolates and result of mating type idiomorph determination

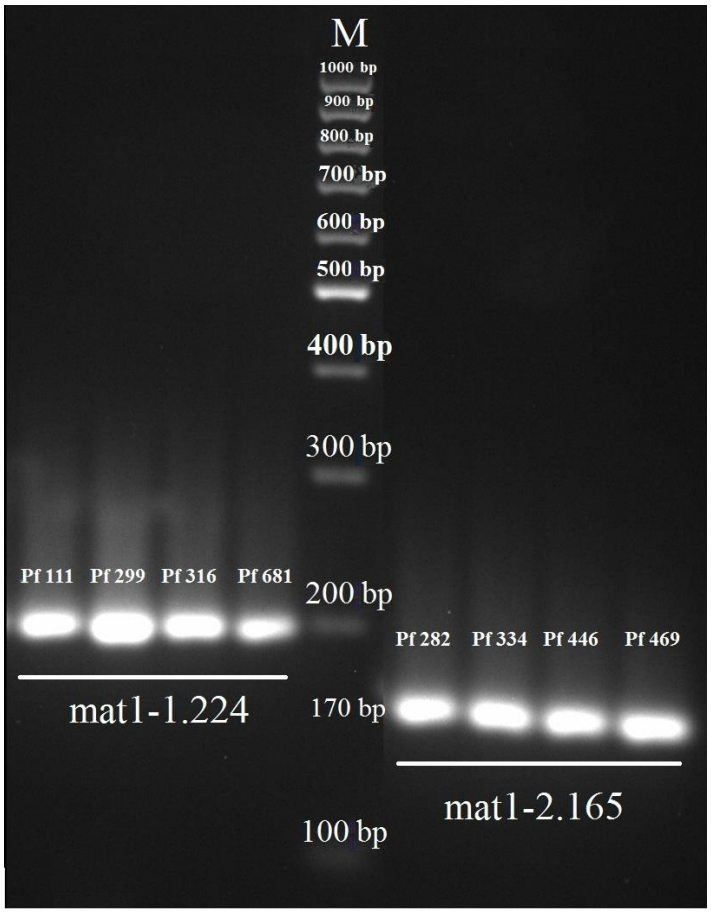
Mat	Host	City	Isolate	No.	Mat	Host	City	Isolate	No.
Mat1-2	Pistachio	Ardakan	Pf 382	63	Mat1-1	Pistachio	Bahreman	Pf 104	1
Mat1-1	Tamarisk	Damghan	Pf 385	64	Mat1-1	Pistachio	Bahreman	Pf 106	2
Mat1-1	Pomegranate	Bahreman	Pf 388	65	Mat1-2	Pistachio	Bahreman	Pf 107	3
Mat1-1	Tamarisk	Bahreman	Pf 389	66	Mat1-1, Mat1-2	Pistachio	Bahreman	Pf 108	4
Mat1-1	Tamarisk	Bahreman	Pf 390	67	Mat1-1, Mat1-2	Pistachio	Bahreman	Pf 109	5
Mat1-1	Tamarisk	Bahreman	Pf 391	68	Mat1-1	Pistachio	Bahreman	Pf 111	6
Mat1-2	Pistachio	Rafsanjan	Pf 396	69	Mat1-1	Pistachio	Bahreman	Pf 117	7
Mat1-1	Pomegranate	Rafsanjan	Pf 402	70	Mat1-1, Mat1-2	Pistachio	Rafsanjan	Pf 124	8
Mat1-2	Baneh	Shahr-e Babak	Pf 407	71	Mat1-1	Pistachio	Rafsanjan	Pf 126	9
Mat1-2	Baneh	Shahr-e Babak	Pf 410	72	Mat1-1, Mat1-2	Pistachio	Rafsanjan	Pf 128	10
Mat1-2	Oleander	Meybod	Pf 424	73	Mat1-1	Pistachio	Rafsanjan	Pf 130	11
Mat1-1	Pistachio	Ardakan	Pf 433	74	Mat1-2	Pistachio	Sirjan	Pf 140	12
Mat1-2	Pistachio	Ardakan	Pf 436	75	Mat1-1	Pistachio	Sirjan	Pf 156	13
Mat1-2	Pistachio	Ardakan	Pf 442	76	Mat1-2	Pistachio	Sirjan	Pf 157	14
Mat1-1	Pistachio	Ardakan	Pf 443	77	Mat1-2	Pistachio	Sirjan	Pf 163	15
Mat1-1	Pistachio	Ardakan	Pf 444	78	Mat1-1, Mat1-2	Pistachio	Sirjan	Pf 173	16
Mat1-2	Pistachio	Ardakan	Pf 446	79	Mat1-1	Pistachio	Sirjan	Pf 187	17
Mat1-1	Pistachio	Ardakan	Pf 450	80	Mat1-1, Mat1-2	Pistachio	Sirjan	Pf 195	18
Mat1-1	Pistachio	Ardakan	Pf 452	81	Mat1-1, Mat1-2	Pistachio	Sirjan	Pf 222	19
Mat1-1	Tamarisk	Ardakan	Pf 455	82	Mat1-2	Pistachio	Naein	Pf 233	20
Mat1-1	Pistachio	Ardakan	Pf 462	83	Mat1-2	Pistachio	Ardestan	Pf 235	21
Mat1-2	Pistachio	Ardakan	Pf 469	84	Mat1-1	Pistachio	Ardestan	Pf 237	22
Mat1-2	Pistachio	Abarkooh	Pf 472	85	Mat1-2	Pistachio	Ardestan	Pf 238	23
Mat1-2	Pistachio	Abarkooh	Pf 473	86	Mat1-2	Pistachio	Ardestan	Pf 239	24
Mat1-1, Mat1-2	Pomegranate	Abarkooh	Pf 475	87	Mat1-1, Mat1-2	Pistachio	Ardestan	Pf 241	25
Mat1-1	Pistachio	Abarkooh	Pf 480	88	Mat1-2	Pistachio	Kashan	Pf 244	26
Mat1-2	Pistachio	Abarkooh	Pf 481	89	Mat1-1, Mat1-2	Pistachio	Qom	Pf 250	27
Mat1-1, Mat1-2	Pistachio	Abarkooh	Pf 486	90	Mat1-2	Pistachio	Qom	Pf 253	28
Mat1-2	Pistachio	Abarkooh	Pf 488	91	Mat1-1	Pistachio	Saveh	Pf 263	29
Mat1-2	Pistachio	Dehshir	Pf 489	92	Mat1-1	Pistachio	Saveh	Pf 265	30
Mat1-2	Almond	Yazd	Pf 492	93	Mat1-2	Pistachio	Mamuniyeh	Pf 282	31
Mat1-1	Pistachio	Marvast	Pf 496	94	Mat1-1, Mat1-2	Pistachio	Mamuniyeh	Pf 283	32
Mat1-1, Mat1-2	Pistachio	Marvast	Pf 499	95	Mat1-2	Pistachio	Mamuniyeh	Pf 285	33
Mat1-1	Pistachio	Khatam	Pf 512	96	Mat1-2	Pistachio	Saveh	Pf 288	34
Mat1-1	Pistachio	Shahr-e Babak	Pf 515	97	Mat1-2	Pistachio	Buin Zahra	Pf 292	35
Mat1-2	Pistachio	Shahr-e Babak	Pf 518	98	Mat1-2	Pistachio	Buin Zahra	Pf 293	36
Mat1-1	Pistachio	Shahr-e Babak	Pf 521	99	Mat1-1	Pistachio	Buin Zahra	Pf 294	37
Mat1-2	Pistachio	Shahr-e Babak	Pf 539	100	Mat1-1	Pistachio	Buin Zahra	Pf 297	38
Mat1-1	Pistachio	Bahreman	Pf 559	101	Mat1-2	Pistachio	Buin Zahra	Pf 298	39
Mat1-2	Pistachio	Zarand	Pf 583	102	Mat1-1	Pistachio	Buin Zahra	Pf 299	40
Mat1-2	Pistachio	Zarand	Pf 586	103	Mat1-1	Pistachio	Eyvanki	Pf 303	41
Mat1-2	Pistachio	Zarand	Pf 601	104	Mat1-2	Pistachio	Eyvanki	Pf 310	42
Mat1-2	Pistachio	Zarand	Pf 613	105	Mat1-2	Pistachio	Eyvanki	Pf 311	43
Mat1-2	Pistachio	Zarand	Pf 623	106	Mat1-1	Pistachio	Eyvanki	Pf 316	44
Mat1-2	Pistachio	Zarand	Pf 628	107	Mat1-1, Mat1-2	Pistachio	Damghan	Pf 317	45
Mat1-2	Pistachio	Kerman	Pf 659	108	Mat1-1, Mat1-2	Pistachio	Damghan	Pf 326	46
Mat1-1	Pistachio	Kerman	Pf 681	109	Mat1-2	Pistachio	Damghan	Pf 328	47
Mat1-2	Pistachio	Kerman	Pf 685	110	Mat1-2	Pistachio	Damghan	Pf 330	48
Mat1-2	Pistachio	Kerman	Pf 694	111	Mat1-2	Pistachio	Damghan	Pf 334	49
Mat1-2	Pistachio	Kerman	Pf 701	112	Mat1-2	Pistachio	Damghan	Pf 336	50
Mat1-1	Haloxylon	Rafsanjan	Pf 728	113	Mat1-2	Pistachio	Damghan	Pf 338	51
Mat1-1	Lebbeck	Rafsanjan	Pf 731	114	Mat1-1	Pistachio	Damghan	Pf 341	52
Mat1-1	Pomegranate	Rafsanjan	Pf 735	115	Mat1-2	Pistachio	Damghan	Pf 344	53
Mat1-1	Air	Rafsanjan	Pf 764	116	Mat1-2	Pistachio	Damghan	Pf 345	54
Mat1-2	Tamarisk	Ferdows	Pf 774	117	Mat1-2	Pistachio	Damghan	Pf 346	55
Mat1-2	Almond	Ferdows	Pf 780	118	Mat1-1	Pistachio	Damghan	Pf 362	56
Mat1-2	Pistachio	Gonabad	Pf 784	119	Mat1-1	Pistachio	Damghan	Pf 367	57
Mat1-1	Haloxylon	Gonabad	Pf 786	120	Mat1-2	Pistachio	Damghan	Pf 368	58
Mat1-2	Pistachio	Feyz Abad	Pf 790	121	Mat1-1	Pistachio	Damghan	Pf 371	59
Mat1-1	Tamarisk	Deyhuk	Pf 797	122	Mat1-2	Pistachio	Damghan	Pf 376	60
Mat1-1	Air	Rafsanjan	Pf 801	123	Mat1-1	Pistachio	Damghan	Pf 377	61
Mat1-1	Air	Rafsanjan	Pf 804	124	Mat1-1	Pistachio	Ardakan	Pf 381	62

توالی‌یابی ایدیومورف‌ها و بررسی شباهت آن‌ها با ایدیومورف‌های گونه *P. variotii*

پس از دریافت توالی‌ها، بررسی کیفیت و اصلاح، تعداد ۱۵۳ نوکلئوتید قابل بررسی برای ایدیومورف Mat1-1 با آغازگر mat1-1.224 در جدایه Pf108 تکثیر شده بود. این تعداد برای ایدیومورف Mat1-2 با آغازگر Mat1-2.165 در جدایه Pf107، ۱۲۵ نوکلئوتید بود. در زمان طراحی آغازگرها انتظار داشتیم با احتساب ۴۰ نوکلئوتید مربوط به آغازگرها، تعداد ۲۲۴ توالی برای Mat1-1 به‌وسیله آغازگر mat1-1.224 تکثیر شود و تعداد مورد انتظار برای Mat1-2 با آغازگر Mat1-2.165 با احتساب ۴۱ نوکلئوتید مربوط به آغازگر، ۱۶۵ نوکلئوتید بود. میزان شباهت ایدیومورف‌های تکثیرشده با ایدیومورف‌های متناظرشان در گونه *P. variotii* بررسی شد و مشخص شد که ایدیومورف Mat1-1 در ناحیه تکثیرشده به میزان ۸۳ درصد و ایدیومورف Mat1-2 در ناحیه تکثیر شده به میزان ۸۹ درصد با ایدیومورف متناظر خود در گونه *P. variotii* شباهت دارند.

تلاقی بین جدایه‌هایی از تیپ‌های آمیزشی متفاوت

پس از گذشت هشت ماه از تلاقی جدایه‌های سازگار از نظر تیپ آمیزشی، هیچ شواهدی مبنی بر وقوع یا شروع تولیدمثل جنسی در تشتک‌های پتری مشاهده نشد. در تلاقی بین جدایه‌هایی از هر دو گروه آمیزشی با قارچ‌هایی که هر دو ایدیومورف را داشتند، تولیدمثل جنسی انجام نشد. در تلاقی جدایه‌های مختلف دارای هر دو ایدیومورف با یکدیگر، تولیدمثل جنسی مشاهده نشد. در بررسی پرگنه خالص جدایه‌هایی که هر دو ایدیومورف را داشتند نیز شواهدی مبنی بر تولیدمثل جنسی به‌صورت هموتال دیده نشد.



شکل ۲. تکثیر و تفکیک ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی در جدایه‌های *P. formosus*، به ترتیب از راست: Pf469، Pf446، Pf334، Pf282، M (Gene ruler 100 bp DNA ladder)، Pf681، Pf316، Pf299 و Pf111 در ژل آگارز یک درصد

Figure 2. Amplification and separation of mating type idiomorphs in *P. formosus* isolates, left to right respectively are; Pf111, Pf299, Pf316, Pf681, M (Gene ruler 100 bp DNA ladder), Pf282, Pf334, Pf446 and Pf469 in 1% agarose gel

بحث

تولیدمثل جنسی در گونه *P. formosus*، تاکنون در دنیا گزارش نشده است (Samson *et al*., 2009)، نتایج این پژوهش نیز با پژوهش‌های پیشین هماهنگ بود و باوجود تلاقی جدایه‌هایی از تیپ آمیزشی متفاوت و نگهداری به مدت هشت ماه، وقوع تولیدمثل جنسی مشاهده نشد، ضمن اینکه به دلیل مشاهده نشدن تولیدمثل جنسی این قارچ در طبیعت و آزمایشگاه، انتظار می‌رود تنوع ژنتیکی ناشی از نوترکیبی میوتیک در جمعیت قارچ وجود نداشته باشد. قارچ عامل بیماری در طول زمستان در کانون‌های آلودگی به حالت غیرفعال، زنده باقی می‌ماند (Ebrahimi, 2012). کلامیدوسپور این قارچ دیواره‌های ضخیمی دارد (Samson, 1974) و در اکثریت جدایه‌ها به‌وفور تولید می‌شود (Samson *et al*., 2009)، لذا با در نظر گرفتن این فرض که تولیدمثل جنسی در جمعیت بیمارگر رخ نمی‌دهد، احتمالاً یکی از عوامل مهم بقای این قارچ، کلامیدوسپور است که مقاوم‌ترین اندام تکثیری این قارچ محسوب می‌شود، البته بقای قارچ به‌صورت میسلیوم در بافت‌های آلوده گیاهی نیز محتمل است.

گونه *P. formosus* از نظر ریخت‌شناسی کاملاً شبیه به گونه *P. variotii* است و به همین دلیل این دو گونه تا سال ۲۰۰۹ به همراه سه گونه *P. dactylethromorphus*، *P. divaricatus* و *P. brunneolus* در کنار یکدیگر در گونه *P. variotii* قرار می‌گرفتند؛ اما تاکسونومی مولکولی نشان داد گونه *P. variotii* sensu lato یک گونه مرکب بوده است (Samson *et al*., 2009). اعضای گونه *P. variotii* sensu stricto توانایی تولیدمثل جنسی به‌صورت هتروتالیک را دارند و تلئومورف این قارچ، گونه *B. spectabilis* است (Houbraken *et al*., 2008). به‌جز فیلوژنی مولکولی تنها تفاوت مهم بین دو گونه *P. formosus* و *P. variotii*، تولید اسید توسط گونه *P. formosus* روی محیط کشت CREA (Creatine Sucrose Agar) و عدم تولید اسید توسط گونه *P. variotii* است (Samson *et al*., 2009; Houbraken *et al*., 2010). دومین تفاوت بین این دو گونه وقوع تولیدمثل جنسی در گونه *P. variotii* و عدم وقوع آن در گونه *P. formosus* است (Houbraken *et al*., 2006; Houbraken *et al*., 2008)؛ اما علاوه بر شباهت‌های ریخت‌شناختی بین این دو گونه، در زمینه ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی نیز شباهت‌هایی مشاهده شد، به‌طوری‌که آغازگرهایی که بر مبنای توالی‌های ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی گونه *P. variotii* طراحی شده بودند به‌خوبی ایدیومورف‌های گونه *P. formosus* را تکثیر نمودند.

تکثیر و ردیابی ایدیومورف‌ها فقط وجود ایدیومورف‌ها در جدایه‌ها را نشان می‌دهد و نمی‌تواند باروری و وقوع تولیدمثل جنسی را مشخص نماید، اما در برخی از قارچ‌ها با استفاده از این اطلاعات امکان تلاقی جدایه‌ها در محیط مصنوعی و وقوع تولیدمثل جنسی میسر شده‌است (Halama & Lacoste, 1992) و شیوه‌ای برای آزمون امکان وقوع تولیدمثل جنسی و بررسی هموتال یا هتروتال بودن گونه قارچ است. در گونه‌های هموتال، یک فرد قارچی هر دو ایدیومورف را در ژنوم خود دارد، اما در گونه‌های هتروتال فقط یکی از ایدیومورف‌ها در ژنوم یک فرد وجود دارد (Houbraken *et al*., 2008).

نتایج این پژوهش نشان داد که دو ایدیومورف Mat1-1 و Mat1-2 با نسبت ۵۰ به ۵۹ (۱ به ۱/۱۸) در جمعیت گونه *P. formosus* پراکنده‌اند و این میزان، با نسبت فراوانی دو ایدیومورف در جمعیت گونه *P. variotii* (Houbraken *et al*., 2008) و اکثریت قارچ‌ها یعنی یک به یک قرابت زیادی دارد. میزان شباهت نوکلئوتیدی ایدیومورف‌های Mat1-1 در گونه *P. variotii* و جدایه‌های موردبررسی در ناحیه تکثیرشده به میزان ۸۳ درصد و ایدیومورف‌های Mat1-2 در ناحیه تکثیرشده به میزان ۸۹ درصد است. این احتمال وجود دارد که تغییر در توالی‌های ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی یکی از عوامل مهمی باشد که باعث شده است گونه *P. formosus* به‌صورت جنسی تولیدمثل ننماید.

البته عدم وقوع تولیدمثل جنسی، لزوماً به معنای نقص در توالی‌های ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی نیست. چنانکه در جمعیت قارچ *Bipolaris sacchari* هر دو ایدیومورف ردیابی شده بودند؛ اما بین جدایه‌هایی از تیپ

آمیزشی مختلف تولیدمثل جنسی رخ نداد، در حالی که شباهت توالی‌های ایدیومورف‌های این گونه با ایدیومورف‌های متناظر از گونه *Cochliobolus heterostrophus* که تولیدمثل جنسی انجام می‌دهد ۹۸-۹۷ درصد است. علت عدم باروری گونه *Bipolaris sacchari* نقص در حداقل یکی از ژن‌های هدف عنوان شده است (Coppin *et al*., 1997). تولیدمثل جنسی در گونه *P. variotii* به‌صورت هتروتال انجام می‌شود و آسکوسپورهای این گونه به حرارت تا ۸۰ درجه سلسیوس مقاوم هستند و می‌توانند سبزیجات و آبمیوه‌های پاستوریزه را فاسد کنند، بنابراین حرارت می‌تواند به‌عنوان فشار انتخابی برای انجام تولیدمثل جنسی روی جدایه‌های این قارچ عمل کند. سه جدایه از این گونه با سایر جدایه‌ها از تیپ آمیزشی سازگار، تولیدمثل جنسی انجام ندادند که نشان می‌دهد این جدایه‌ها توانایی تولیدمثل جنسی را از دست داده‌اند. احتمالاً این امر ناشی از نگهداری طولانی و کشت مجدد آنها در محیط مصنوعی است یا به دلیل عدم وجود فشار انتخابی مثل حرارت، توان تولیدمثل جنسی را از دست داده‌اند. به‌طور مثال جدایه CBS 110431 از نان چاودار جداسازی شده است که این جدایه برای آلوده کردن نان نیازی به مقاومت به حرارت ندارد و این جدایه ممکن است در اثر تکثیر متوالی به صورت غیرجنسی توان تولیدمثل جنسی را از دست داده باشد (Houbraken *et al*., 2008).

جدایی تولیدمثلی و عدم امکان تولیدمثل تعدادی از افراد یک جمعیت با بقیه افراد جمعیت یکی از مکانیسم‌های گونه‌زایی و تشکیل گونه‌های خواهری است (Futuyma, 1998). موانع آمیزشی می‌توانند جمعیت‌هایی را که برای ماندن در یک تاکسون شباهت کافی باهم دارند را به گونه‌های ژنتیکی متفاوتی مجزا نمایند (Mostowfizadeh Galamfarsa & Habibi, 2010). لذا این احتمال وجود دارد که دو گونه *P. variotii* و *P. formosus* دارای یک جد مشترک بوده‌اند که جد مشترک به‌صورت جنسی و غیرجنسی تکثیر می‌شده است، اما در طول تکامل، تعدادی از جدایه‌ها توان تولیدمثل جنسی خود را از دست داده‌اند، صرفاً به شیوه غیرجنسی تکثیر شده‌اند و به دلیل جدایی تولیدمثلی تشکیل یک جمعیت جداگانه را داده‌اند و در یک فرآیند گونه‌زایی قرار گرفته و به‌تدریج از نظر ژنتیکی تغییر نموده‌اند و تشکیل گونه جدید *P. formosus* را داده‌اند که با بقیه افراد که اکنون گونه *P. variotii* را تشکیل می‌دهند تفاوت پیدا کرده‌اند.

گونه *P. variotii* الگوی هتروتالیسم دوقطبی با دو ایدیومورف متفاوت Mat1-1 و Mat1-2 را از خود نشان داده است (Houbraken *et al*., 2008). در هتروتالیسم دوقطبی، دو ایدیومورف متفاوت وجود دارد که در ژنوم یک فرد هاپلوئید خالص فقط یکی از آن‌ها موجود است (Mostowfizadeh Galamfarsa & Habibi, 2010). گونه *P. formosus* نیز با توجه به تکثیر دو ایدیومورف جداگانه که در اغلب موارد در هر جدایه فقط یکی از آن‌ها موجود است، می‌تواند تابعی از این الگو باشد؛ اما در این پژوهش در ۱۲/۱ درصد از جدایه‌های مورد آزمایش هر دو ایدیومورف ردیابی شده‌اند. موارد مشابهی در منابع وجود دارد. در پژوهش Sommerhalder *et al*. (2005) در یک درصد از جدایه‌های گونه *Stagonospora nodorum* هر دو ایدیومورف ردیابی شدند که آن‌ها این پدیده را ناشی از اختلاط جدایه‌ها یا آلودگی در مراحل مختلف کار دانستند. Houbraken *et al*. (2008) نیز چنین پدیده‌ای را نتیجه عدم خلوص جدایه و اختلاط دو جدایه از تیپ جنسی مختلف دانسته‌اند.

در گونه‌های *Neurospora crassa*، *Podospora anserina* و *Cochliobolus heterostrophus* در یک هسته واحد هر دو ایدیومورف ردیابی شده است که علت آن تبادل قطعه (transloction) بین کروموزوم‌های غیر خواهری است. البته چنین جدایه‌هایی در تولیدمثل به‌صورت خودلقاحی و در تلاقی با جدایه‌های آزمایشگر، پریتسیوم‌های عقیم تولید می‌کنند (Coppin *et al*., 1997).

هتروتالیسم یک صفت اجدادی است، اما در جمعیت‌های برخی قارچ‌هایی که اجداد هتروتال دارند، تعدادی از افراد وجود دارند که هر دو ایدیومورف را روی یک کروموزوم، در نزدیکی یکدیگر و گاهی چسبیده به هم دارند و به شیوه هموتال تولیدمثل می‌کنند. علت این امر این است که در مسیر تکامل در

اثر وقوع نوترکیبی در جمعیت قارچ، افراد هتروتال به هموتال تکامل یافته‌اند (Yun *et al*., 1999).

گونه‌های *Podospora anserina*، *Neurospora tetrasperma* و *Gelasinospora tetrasperma* در حقیقت هتروتال هستند؛ اما گاهی به‌صورت هموتال کاذب (pseudohomothallic) تولیدمثل جنسی انجام می‌دهند. علت این است که ریسه‌های این قارچ‌ها هتروکاریون هستند و در هسته‌های ناجور، ایدیومورف‌های متفاوت وجود دارند (Coppin *et al*., 1997; Davis & weller, 1998).

تا قبل از این پژوهش، فقط روی تولیدمثل جنسی جدایه‌هایی از گونه *P. formosus* که از نمونه‌های کلینیکی به‌دست آمده بودند تحقیق شده بود (Houbraken *et al*., 2008; Houbraken *et al*., 2010; Samson *et al*., 2009)، اما جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش، عامل بیماری در گیاهان مختلف و از مناطق جغرافیایی متفاوتی بودند. با این وجود، وقوع تولیدمثل جنسی در جمعیت گونه به اثبات نرسید. لذا نتایج این پژوهش، بخشی از بیولوژی قارچ شامل عدم تولیدمثل به‌صورت جنسی در شرایط آزمایشگاهی موردبررسی، احتمال گذراندن شرایط نامساعد به‌صورت اندام یا اسپور غیرجنسی و امکان نوترکیبی ژنتیکی میوتیک را آشکار نموده است.

REFERENCES

1. Alizadeh, A., Alaei, H. & Ershad, D. (2000). Etiological study on dieback disease of pistachio trees in Rafsanjan. *Journal of Modares Agricultural Sciences*, 1(2), 53-63. (in Farsi)
2. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
3. Aminaei, M. M. & Ershad, D. (1989). Pistachio dieback disease in Kerman province. In: Proceedings of *9th Iranian Plant Protection Congress*, 8-13 Sept., Mashhad, Iran. P. 82.
4. Ashkan, M., Abusaidi, D. & Ershad, D. (1997). Etiological study of dieback and canker of pistachio nut tree in Rafsanjan. Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 33, 15-26. (In Farsi) & 5-6. (in English)
5. Blastn [online software]. (2014). Retrieved July 30, 2014, from https://blast.ncbi.nlm.nih.gov
6. Chromas Pro 1.7.6 [computer software]. (2014). Retrieved July 30, 2014, from http://technelysium.com.au/wp/chromaspro.
7. Burdon, J. J. & Thrall, P. H. (2009). Co-evolution of plants and their pathogens in natural habitats. *Science*, 324, 755-756.
8. Coppin, E., Debuchy, R., Arnaise, S. & Picard, M. (1997). Mating types and sexual development in filamentous Ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), 411-428.
9. Davis, R. H. & Weller, S. G. (1998). *The gist of genetics*. Jones and Bartlett publishers.
10. Döll, K., Chatterjee, S., Scheu, S., Karlovsky, P. & Rohlfs, M. (2013). Fungal metabolic plasticity and sexual development mediate induced resistance to arthropod fungivory. In: Proceedings of *the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *280*(1771), 20131219.
11. Ebrahimi, S. (2012). *Study on genetic diversity of Paecilomyces variotii isolates in Kerman province*. M.Sc. thesis. Departmant of Plant Protection, University of Zabol, Iran.
12. Ershad, D. (2009). *Fungi of Iran.* (3rd ed.). Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran.
13. Futuyma, D. J. (1998). *Evolutionary biology*. Sinauer Associates, Inc.
14. Ghelichi, M., Mohammadi, A., Haghdel, M. & Eskandari, A. (2012). Distribution of pistachio die-back in Khorasan-Razavi province and application of some fungicides for the disease control. *International Journal of Nuts and Related Sciences*, 3(1), 23-28.
15. Haghdel, M. (2008). *Pistachio die back disease in Iran.* 1st ed., Iranian Pistachio Research Institute.
16. Halama, P. & Lacoste, L. (1992). Determination of sexual reproduction of *Phaeosphaeria* (*Leptosphaeria*) *nodorum* agent of septoriose of wheat. Action de la temperature et de la lumière. *Canadian Journal of Botany*, 70, 1563-1569.
17. Heidarian, R., Fotouhifar, Kh.-B., Mohammadi, A. H., Javan-Nikkhah, M., Debets, A. J. M. & Aanen, D. K. (2015a). Host diversity and distribution of *Paecilomyces formosus*, the causal agent of pistachio die-back disease in Iran. In: Proceedings of *2nd Iranian Mycological Congress*, 23-25 Aug., University of Tehran, Karaj, Iran, P. 210.
18. Heidarian, R., Fotouhifar, Kh.-B., Mohammadi, A. H., Javan-Nikkhah, M., Debets, A. J. M. & Aanen, D. K. (2015b). Phylogeny of genus *Paecilomyces* sp., the causal agent of Pistachio die-back disease in Iran. In: Proceedings of *2nd Iranian Mycological Congress*, 23-25 Aug., University of Tehran, Karaj, Iran, P. 30.

19. Heitman, J., Sun, S. & James, T. Y. (2013). Evolution of fungal sexual reproduction. *Mycologia*, 105(1), 1-27.
20. Houbraken, J., Samson, R. A. & Frisvad, J. C. (2006). *Byssochlamys*: significance of heat resistance and mycotoxin production. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 571, 211-224.
21. Houbraken, J., Varga, J., Rico-Munoz, E., Johnson, S. & Samson, R. A. (2008). Sexual reproduction as the cause of heat resistance in the food spoilage fungus *Byssochlamys spectabilis* (anamorph *Paeclomyces variotii*). *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), 1613-1619.
22. Houbraken, J., Verweij, P. E., Rijis, A. J. M. M., Borman, A. M. & Samson, R. A. (2010). Identification of *Paecilomyces variotii* in clinical samples and settings. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8), 2754-2761.
23. Iranian Pistachio Society Journal. (2014). *Pistachio*. Retrieved March 18, 2015, from www.Iranpistachio.org.
24. Jamali, S. & Banihashemi, Z. (2011). First report of *Byssochlamys spectabilis* as a teleomorph of *Paecilomyces variotii* from Iran. *Rostaniha*, 12(2), 191-192.
25. Luangsa-ard, J. J. & Hywel-Jones, N. L. (2004). The polyphasic nature of *Paecilomyces* sensu lato based on 18S-generated rDNA phylogeny. *Mycologia*, 96(4), 773-780.
26. McCarthy, C. (1996). *Chromas: version 1.3*. Brisbane, Griffith University
27. Mohammadi, A. & Haghdel, M. (2006). *Diseases of dried fruit trees in temperate areas*. (1st ed.). IPRI.
28. Mozafari, V., Malakouti, M. J., Kholdebarin, B. & Bybordi, M. (2006). Investigation of some causes of die-back disorder of pistachio trees and its control through balanced fertilization in southern Iran. *Iranian Journal of Soil and Waters Sciences*, 19(2), 154-164. (in Farsi)
29. Mostowfizadeh Galamfarsa, R. & Habibi, A. (2010). *Essential fungal genetics*. (1st ed.). Academic center for education, culture and research of Mashhad.
30. Ni, M., Feretzaki, M., Sun, S., Wang, X. & Heitman, J. (2011). Sex in fungi. *Annual Review of Genetics*, 45, 405- 430.
31. Oligo Analyzer 3.1 [online software]. (2014). Retrieved July 10, 2014, from eu.idtdna.com.
32. Offerman, J. D. & Rychlik, W. (2003). Oligo Primer Analysis Software. In Krawetz, S. A. and Womble, D. D. (Ed), Introduction to bioinformatics: a theoretical and practical approach. (pp. 345-361) Humana Press Inc.
33. Primer3web, version 4.0.0 [online software]. (2013). Retrieved July 10, 2014, from Primer3.ut.ee.
34. Samson, R. A. (1974). *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6, 1-119.
35. Samson, R. A., Houbraken, J., Varga, J. & Frisvad, J. C. (2009). Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. *Persoonia*, 22, 14-27.
36. Solomon, P. S., Parker, K., Loughman, R. & Oliver, R. P. (2004). Both mating types of *Phaeosphaeria* (anamorph *Stagonospora*) nodorum are present in Western Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 763-766.
37. Untergasser, A., Cutcutache, L., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. & Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), 115.
38. Yun, S. H., Berbee, M. L., Yoder, O. C. & Turgeon, B. G. (1999). Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self-sterile ancestors. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences*, 96, 5592-5597.