**Iranian Journal of Plant Protection Science**
Vol 49, No 1, Spring & Summer 2018 (23-31)
DOI: 10.22059/ijpps.2017.215320.1006734

**دانش گیاهپزشکی ایران**
دورهٔ ۴۹، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۷ (ص ۳۱-۲۳)

# تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *Venturia inaequalis* روی رقم‌های مختلف سیب در شمال ایران

**لیلا ابراهیمی[۱]، خلیل‌بردی فتوحی‌فر[۲*]، محمد جوان نیک‌خواه[۳] و محمدرضا نقوی[٤]**

۱. استادیار، گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران ۵۳۷۵۵-۳۳۹۱۶، ایران و دانشجوی دکتری، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ۷۷۸۷۱-۳۱۵۸۷، ایران

۲ و ۳. دانشیار و استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ۷۷۸۷۱-۳۱۵۸۷، ایران

٤. استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/٦/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۲/۱٦)

## چکیده

بیماری لکهٔ سیاه سیب مهم‌ترین بیماری اقتصادی این محصول است که سالیانه باعث همه‌گیری (اپیدمی)هایی در نقاط مختلف جهان می‌شود. این بیماری سالیانه باعث خسارت‌های کمی و کیفی در مناطق مختلف کاشت سیب در کشور می‌شود. در این مطالعه، تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *Venturia inaequalis* روی رقم‌های مختلف سیب با استفاده از ۱۸ نشانگر ریز ماهواره بررسی شد. تعداد ۵۱ جدایهٔ حاصل از نمونه‌های برگ و میوهٔ آلوده از روی رقم‌های سیب وحشی، بومی و تجاری در استان‌های شمالی کشور (مازندران، گلستان و گیلان) انتخاب و مطالعه شدند. تعداد ۲۸ آغازگر ریزماهواره جهت بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شدند که از بین آن‌ها ۱۸ آغازگر بین جدایه‌های مختلف چندشکل بودند. تجزیه‌وتحلیل واریانس مولکولی AMOVA نشان داد، ۹۷درصد تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها و فقط ۳درصد تنوع در بین جمعیت‌ها پراکنده است. مقادیر به‌دست‌آمده برای شاخص‌های تنوع ژنی شامل تنوع ژنی نِئی و شاخص شانون و همچنین تعداد آلل‌های موجود در هر جمعیت، نشان داد که تنوع درون جمعیت در جمعیت حاصل از رقم‌های بومی نسبت به رقم‌های وحشی و تجاری بیشتر است. جمعیت حاصل از رقم‌های تجاری نیز نسبت به رقم‌های وحشی تنوع بیشتری را نشان داده‌اند. تنوع ژنتیکی زیاد این قارچ درون جمعیت‌ها به دلیل تولیدمثل سالیانهٔ قارچ، جریان ژنی بین جمعیت‌ها و به‌احتمال قدمت طولانی‌مدت قارچ در این منطقه است.

**واژه‌های کلیدی:** تنوع ژنتیکی، شمال ایران، لکهٔ سیاه سیب، SSR.

# Diversity and population genetic structure of *Venturia inaequalis* on different apple cultivars in the north of Iran

**Leila Ebrahimi[1], Khalil-Berdi Fotouhifar[2*], Mohammad Javan Nik Khah[3] and Mohammad-Reza Naghavi[4]**

1. Assistant Professor, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, 33916-53755, Iran and Ph. D. Candidate, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, 31587-77871, Iran

2, 3. Associate Professor and Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, 31587-77871, Iran

4. Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Sep. 12, 2016 - Accepted: May 6, 2017)

## ABSTRACT

Apple scab disease caused by *Venturia inaequalis* is the most important economic disease worldwide where the apple is grown and causes annual epidemics. It reduces the quality and quantity of the yields in different regions of Iran. In this study, diversity and population genetic structure of *V. inaequalis* were surveyed on different apple cultivars using 18 microsatellite markers. 51 isolates were obtained from infected leaf and fruit specimens from wild apple, Iranian endemic and commercial apples from Northern provinces of Iran (Mazandaran, Golestan and Guilan). 28 SSR primers were used to investigate the genetic diversity of this pathogen. Among them, 18 primers showed polymorphism between isolates and populations. AMOVA analyses revealed that 97% of the variation was distributed among individuals within populations, and 3% was attributable to the differences among populations. Gene diversity indexes including Nei's gene diversity, Shannon index and allele numbers in every population showed that diversity within the population on endemic cultivars is more than the diversity in the population of wild and commercial cultivars. Also, the population of commercial cultivars has more diversity in comparison with the wild population. High genetic diversity within the populations is caused by annual sexual reproduction, gene flow between populations and probably the existence of this fungus for a long time in this region.

**Keywords:** Apple scab, genetic diversity, North of Iran, SSR.

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

## مقدمه

قارچ *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter عامل بیماری لکهٔ سیاه درختان سیب است که این بیماری از نظر اقتصادی مهم‌ترین بیماری قارچی روی این میزبان محسوب می‌شود (Ruszkiewicz-Michalska & Połeć, 2006) و سالیانه باعث همه‌گیری (اپیدمی)هایی در نقاط مختلف جهان به‌ویژه در مناطق کشت سیب شده (Xu *et al*., 2009) و به‌ویژه در مناطقی که فصول بهار و اوایل تابستان هوا خنک و مرطوب باشد، خسارت بیماری شدید خواهد بود (Ashkan, 2011). طبق گزارش Ershad (2009)، اسفندیاری در سال ۱۳۲۵ این قارچ را برای اولین بار از ایران گزارش نموده است.

در کلیهٔ مناطق دارای آب‌وهوای خنک، درخت سیب به‌طور وسیع کشت می‌شود. در ایران نیز قرن‌هاست سیب کشت می‌شود. لکهٔ سیاه سیب در بیشتر مناطق کشت سیب در کشور شیوع دارد، ولی در باغ‌های سیب استان‌های مازندران، گلستان، آذربایجان شرقی و غربی، و کوهپایه‌های جنوبی البرز در استان تهران، بیشتر شایع است و خسارت آن روی رقم‌های حساس سیب گاهی به ۱۰۰ درصد محصول نیز می‌رسد (Ashkan, 2011). در حال حاضر، کنترل این بیماری با استفادهٔ مکرر از قارچ‌کش‌های شیمیایی و همچنین رقم‌های مقاوم صورت می‌گیرد، که در طی زمان، پیدایش جدایه‌های مقاوم به سموم و همچنین نژادهای بیمارگر روی رقم‌های مقاوم، کارایی این روش‌ها را با مشکل روبرو می‌کند. در این زمینه، دانشمندان پایهٔ ژنتیکی مقاومت در سازگان بیماری (پاتوسیستم) سیب (*V. inaequalis*) را مشخص کرده‌اند و نژادهای جدیدی از قارچ را شناسایی نموده‌اند، که این امر منجر به درک بهتر مکانیسم مقاومت برای توسعهٔ روش‌های کنترل پایدار شده است (Padder *et al*., 2012).

پتانسیل تغییرپذیری ژنتیکی بیمارگر از عوامل مهم مؤثر بر شکسته شدن مقاومت در میزبان و بی‌اثر شدن سموم شیمیایی علیه بیمارگر است. بیمارگرهایی که قابلیت (پتانسیل) تغییرپذیری بیشتری داشته باشند، توانایی بیشتری جهت شکستن مقاومت میزبان و بی‌اثر کردن سموم شیمیایی دارند. تخمین پتانسیل تغییرپذیری بیمارگرها بر اساس تجزیه‌وتحلیل ساختار ژنتیک جمعیت آن‌ها امکان‌پذیر است. نیروهای تکاملی مختلفی که در طول تاریخ زندگی بیمارگرها برقرار بوده‌اند، در شکل‌گیری جمعیت‌ها و وضعیت کنونی آن‌ها تأثیرگذار می‌باشند. نوع سیستم تولیدمثلی و میزان برقراری جریان ژنی/نژادگانی (ژنوتیپی) از عوامل تأثیرگذار بر ساختار ژنتیک جمعیت بیمارگرها هستند. به‌عنوان‌مثال، بیمارگرهای دارای سیستم تولیدمثلی مختلط (جنسی و غیرجنسی) امتیازات بیشتری در جهت تکامل دارند (McDonald, 2002).

قارچ *V. inaequalis* سیستم آمیزشی هتروتالیک دارد. تولیدمثل جنسی در این‌گونه، بقای قارچ را در شرایط نامساعد فصل زمستان تضمین می‌کند (Boehm *et al*., 2003). همچنین تولیدمثل جنسی به دلیل پتانسیل زیاد در تغییرپذیری ژنتیکی قارچ در فرایند تقسیم میوز، امکان بقای قارچ را در برابر رقم‌های مقاوم و سموم شیمیایی افزایش می‌دهد. از طرفی، تولیدمثل غیرجنسی مکرر در طی فصول بهار و تابستان، باعث افزایش تغییرپذیری و تنوع قارچ می‌شود. به همین دلیل در مطالعات مربوط به ژنتیک جمعیت و تنوع ژنتیکی در این گونه‌های قارچی، تنوع ژنتیکی زیادی به‌ویژه درون جمعیت‌ها مشاهده می‌شود و این امر کنترل بیماری را اغلب با مشکل مواجه می‌کند (Bruce *et al*., 2002).

Zhang (2010) تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مربوط به گونهٔ *V. inaequalis* به‌دست‌آمده از باغ‌های ایالت پنسیلوانیای امریکا را با استفاده از هفت نشانگر ریزماهواره ارزیابی کرد. نتایج بررسی‌ها نشان دادند، تنوع ژنتیکی کل در جمعیت‌های محلی زیاد است. این امر نشان می‌دهد، قارچ *V. inaequalis*، یک بیمارگر با پتانسیل تکاملی زیاد بوده که نوترکیبی جنسی سالانهٔ قارچ از جمله عوامل آن است.

تنوع و ساختار ژنتیکی، پتانسیل تکامل و تحول قارچ را در طول تاریخ تکاملی آن نشان می‌دهد (McDonald, 1997). همچنین تنوع ژنتیکی می‌تواند منشأ بیمارگر دارای تنوع ژنتیکی زیاد در یک منطقه را مشخص نماید. همچنین بر اساس پیش‌فرض

(سناریوی) تکامل همزمان میزبان-بیمارگر، بیمارگر می‌تواند منشأ یکسانی با میزبان خود داشته باشد (Stukenbrock & McDonald, 2008).

بر اساس نتایج مطالعات Gharghani *et al.* (2009) روی رقم‌های مختلف سیب در جهان، منشأ سیب آسیای مرکزی است. هرچند در مطالعات آن‌ها نمونه‌های سیب وحشی ایران بررسی نشده است. نتایج آنان نشان داد، رقم‌های بومی سیب ایران نقش حدواسط را در اهلی‌سازی و گسترش سیب در جهان داشته است. از طرفی Gladieux *et al.* (2008) ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ عامل بیماری لکهٔ سیاه را در جهان با استفاده از نشانگر ریزماهواره بررسی کردند. نتایج حاصل از مطالعات آنان آسیای مرکزی را به‌عنوان منشأ این بیمارگر معرفی کرد.

با توجه به این نتایج، ایران به‌ویژه منطقهٔ شمال کشور که سیب وحشی در جنگل‌های این منطقه پراکنده است، می‌تواند نقش مهمی در پراکنش این بیمارگر در طی مسیر جادهٔ ابریشم از آسیای مرکزی به سایر نقاط جهان داشته باشد. با توجه به اهمیت اقتصادی بیماری لکهٔ سیاه سیب در ایران و جهان و نبود اطلاعات در مورد ساختار جمعیت و پراکنش این بیماری در کشور، در این مطالعه تنوع و ساختار ژنتیکی قارچ عامل بیماری لکهٔ سیاه در شمال کشور (شامل استان‌های گلستان، گیلان و مازندران) بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی نمونه‌های قارچی

نمونه‌های آلودهٔ گیاهی شامل برگ و میوهٔ درختان سیب که علائم بیماری و حاوی اندام‌های باردهی قارچ داشتند، جمع‌آوری شدند. نمونه‌برداری در سه استان شمالی کشور شامل مازندران، گلستان و گیلان از مناطق جنگلی، حیاط منازل و باغ‌های مختلط و تک‌کشتی در سال ۱۳۹۳ انجام شد. جمع‌آوری نمونه به‌صورت تصادفی بوده و نمونه‌های مربوط به هر گیاه به‌عنوان یک نمونه مجزا در نظر گرفته شدند. نمونه‌های گیاهی به‌صورت جداگانه درون 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 میلهٔ شیشه‌ای خمیده روی محیط کشت آب-آگار ۲ درصد (water agar 2%) پخش شدند و به مدت یک روز در دمای ۱۸ درجهٔ سلسیوس، جهت جوانه‌زنی کنیدی‌ها، نگهداری شدند. سپس به روش تک اسپور (single spore) و در زیر میکروسکوپ، کنیدی‌های جوانه‌زده انتخاب و به محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) منتقل شدند. پرگنه‌های قارچی، در دمای ۱۸ درجهٔ 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 لاکتوفنل-کاتن‌بلو تهیه و سپس به لحاظ ویژگی‌های مختلف ریخت‌شناختی، جدایه‌های قارچی ارزیابی شدند. برای شناسایی در سطح گونه از تک‌نگارهٔ نوشته‌شده توسط Schubert *et al.* (2003) استفاده شد.

### استخراج DNA

جهت تهیهٔ تودهٔ قارچی **از** محیط غذایی PDA و سلوفان سلولزی استفاده شد. در این روش، قطعه‌ای به ابعاد ۵×۴ سانتی‌متر از سلوفان سترون‌شده در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه، روی محیط کشت PDA قرار داده شد. سپس میسلیوم قارچ یک‌ماهه از روی محیط کشت PDA برداشته شد و روی سلوفان پخش شد. تشتک‌های پتری در دمای ۱۶ تا ۱۸ درجهٔ سلسیوس به مدت ده روز تا دو هفته نگهداری شدند، تا پرگنهٔ قارچ به‌اندازهٔ کافی رشد کند. سپس، میسلیوم حاصل روی سلوفان با استفاده از کاردک (اسکالپل) سترون برداشته شد و با استفاده از دستگاه خشک‌کن در سرما ( freeze dryer) کامل خشک شدند. میسلیوم‌های خشک‌شدهٔ هر جدایه پودر شده و در ریزلوله (میکروتیوپ)های سترون در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس تا زمان استخراج DNA نگه‌داری شدند.

استخراج DNA ژنگانی (ژنومی) با استفاده از میسیلوم خشک‌شدهٔ هر جدایهٔ قارچی و بافر استخراج DNA ایرایزول (شرکت زیست‌فناوران رنا، ایران) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از ژل‌آگارز ۱درصد و نانودراپ (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) مشخص شد. سپس نمونه‌های DNA به غلظت ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر رقیق و در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند.

**بررسی چندشکلی جدایه‌های قارچی بر اساس نشانگر ریزماهواره**

به‌منظور بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ روی رقم‌های مختلف سیب، ۲۸ آغازگر ریزماهواره (Tenzer *et al*., 1999; Guerin *et al*., 2004) استفاده شد (جدول ۱). تکثیر DNA ژنگانی (ژنومی) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در یک مخلوط واکنش ۱۰ میکرولیتری شامل ۲ میکرولیتر از بافر PCR 5X، ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۱۶ میلی‌مولار از dNTPs، یک واحد از آنزیم *Taq* DNA Polymerase (Promega, Madison, WI) و ۲ میکرولیتر از DNA الگو (۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) انجام گرفت. برنامهٔ حرارتی PCR جهت تکثیر به این ترتیب بود: واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ سلسیوس به مدت پنج دقیقه، سپس ۳۰ چرخه شامل: ۱) واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجهٔ سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، ۲) اتصال آغازگرها به ناحیهٔ هدف در ۵۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه و ۳) بسط رشته در ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه و بسط نهایی رشته در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ده دقیقه. جهت مشاهدهٔ محصول PCR و تعیین اندازه‌های اللی و تفکیک الل‌های نواحی SSR تکثیرشده، از ژل Agarose SFR™ (agarose super fine resolution) (Amresco, Solon, OH) ۳/۵ درصد و الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت چهار ساعت استفاده شد.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای (چندشکل) مورد استفاده جهت مطالعهٔ ساختار ژنتیکی جمعیت‌های *Venturia inaequalis* روی رقم‌های مختلف سیب در شمال ایران

Table 1. Primers used for investigation of genetic structure of *Venturia inaequalis* populations on different apple cultivars in the North of Iran

| Locus | Primer sequence | Repeat motif | References |
|---|---|---|---|
| 1tc1a | 5'-TCGAGATCCTCAAACTTCCTT-3'<br>5'-TTTTAACTGTGCGGCCTG-3' | $(TC)_{17}$ | Tenzer *et al*. (1999) |
| 1tc1b | 5'-CGATTGGGGATATGAAGACTT-3'<br>5'-TTAGTAATCAAATCGCACCCA-3' | $(TC)_3CC(TC)_2CC(TC)_6CC(TC)_7$ | Tenzer *et al*. (1999) |
| 1tc1g | 5'-TCACTCAACAATACAGTTTCTTACG-3'<br>5'-TTTCACGGTAGCGATAGGAG-3' | $(CT)_{26}$ | Tenzer *et al*. (1999) |
| 1aac4b | 5'-GGTGAGGAGGGAGACGAG-3'<br>5'-CATCACGCCCCTATCAAAC-3' | $(GTT)_6GTC(GTT)GTC(GTT)_3$ | Tenzer *et al*. (1999) |
| 1aac3b | 5'-AGCGCTAGGTCGTGAAATC-3'<br>5'-TTTCTGAAGTGTGTGGGACAT-3' | $(CAA)_7$ | Tenzer *et al*. (1999) |
| 1aac4f | 5'-CTTGACAGACCACAGCGAC-3'<br>5'-CTGACTGAGAGTGGCATCG-3' | $(CAA)_3$ | Tenzer *et al*. (1999) |
| Vitc1/2 | 5'-CTTACCTCTCACTTGCTAAC-3'<br>5'-GTTCTGACAAGACTGTGTTG-3' | $(TC)_{17}$ | Guerin *et al*. (2004) |
| Vict1/130 | 5'-GATTGGTGACGCATGTGT-3'<br>5'-GCTGGAGATTGCGTAGAC-3' | $(CT)_{11}$ | Guerin *et al*. (2004) |
| Vitc2/D | 5'-GCTCCTTCTGGGTAAGA-3'<br>5'-CTCTACATCTCATCCCATC-3' | $(TC)_{15}$ | Guerin *et al*. (2004) |
| Vica9/152 | 5'-GCACCTGCTCTGTCTATCTC-3'<br>5'-AAGGTTCAGGCACTGGAG-3' | $[(CA)_2C]_2CCAGAC[(CA)_3C]_3$ | Guerin *et al*. (2004) |
| Vitg11/70 | 5'-GAAGAGGTTGGAGTGGTTG-3'<br>5'-GAACCGAATCTGTACAGGAC-3' | $(TG)_{12}$ | Guerin *et al*. (2004) |
| Vica9/X | 5'-TCGCGCATCACTATCTACAC-3'<br>5'-AGACAGGAATGTGGTGGAAG-3' | $(CA)_8$ | Guerin *et al*. (2004) |
| Vica9/134 | 5'-ATACAGGAGTGAACAGCAGG-3'<br>5'-ATACTGCTCACTTGCGTGC-3' | $(CA)_5AA(CA)_9$ | Guerin *et al*. (2004) |
| Vigtg10/95 | 5'-AGGTGTTGCTGTCTTGGAG-3'<br>5'-CGATAGTGTCATTTCCAATCC-3' | $(GTGGTGT)_4$ | Guerin *et al*. (2004) |
| Viga7/116 | 5'-GCCTGGTTGTGGATCTGTC-3'<br>5'-ATCCTGCTACATCGACCTTC-3' | $(GA)_{17}$ | Guerin *et al*. (2004) |
| Vicacg8/42 | 5'-TGTCAGCCACGCTAGAAG-3'<br>5'-CACCGGACGAATCATGC-3' | $[(CA)_nCG]_n$ | Guerin *et al*. (2004) |
| Vigt10/ε | 5'-GCAGTGCAGGAATAGTAAGG-3'<br>5'-GCTGTGATACCAGAGAACGA-3' | $(GT)_4GC(GT)_3$ | Guerin *et al*. (2004) |
| Vitg9/129 | 5'-CTAATTCAACTCGCTGCGTC-3'<br>5'-TTTCAGCCAGCTAACCTAGG-3' | $(TG)_8$ | Guerin *et al*. (2004) |

**تجزیه‌وتحلیل داده‌ها**

تعیین خنثی و یا عدم خنثی بودن ریزماهواره‌ها بر اساس آزمایش اونز-واترسون (Ewens-Watteson test of neutrality) و همچنین تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها و کل جدایه‌های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار PopGene Version 1.32 (Yeh *et al*., 1999) انجام شد. جریان ژنی ($N_m$) و تمایز ژنتیکی ($F_{st}$) با استفاده از نرم‌افزار GenALex 6.5 (Peakal & Smous, 2012) محاسبه شدند. شاخص شانون (I) به‌عنوان یک معیار اندازه‌گیری تنوع ژنی و فاصلهٔ ژنتیکی Nei (1987) نیز بین جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای PopGene (Yeh *et al*., 1999) و GenALex (Peakal & Smous, 2012) به‌دست آمدند. نمودار (دندروگرام) UPGMA بر اساس فاصلهٔ ژنتیکی Nei نیز با استفاده از نرم‌افزار PopGene (Yeh *et al*., 1999) رسم شد.

تجزیه‌وتحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) نیز با استفاده از نرم‌افزار GenALex (Peakal & Smous, 2012) انجام شد. همچنین ماتریس فاصلهٔ ژنتیکی بین تمام جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق به دست آمد و تجزیه به مختصات اصلی (PcoA) برای آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenALex (Peakal & Smous, 2012) محاسبه شد.

## نتایج و بحث

در طی نمونه‌برداری ۹۰ نمونه برگ و میوهٔ درختان سیب آلوده به لکهٔ سیاه سیب از سه استان شمالی جمع‌آوری شدند. از بین این نمونه‌ها ۵۱ نمونه از روی رقم‌های مختلف شامل بیست نمونه از روی سیب وحشی (*Malus orientalis*) جمع‌آوری شده از مناطق جنگلی، بیست نمونه از روی رقم‌های بومی ایران (*Malus domestica*) و یازده نمونه از روی رقم‌های تجاری (*Malus domestica*: Golden Red, Golden delicious) جهت بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت روی رقم‌های مختلف انتخاب شدند. در طی نمونه‌برداری، میزان آلودگی متفاوتی روی رقم‌های مختلف مشاهده شد. تمامی درختان سیب وحشی در مناطق جنگلی به‌شدت آلوده به لکهٔ سیاه بودند. بعد از آن، رقم‌های بومی در ردهٔ دوم قرار می‌گرفتند و در نهایت رقم‌های تجاری بودند که حتی در باغ‌های مخلوط آلوده، این رقم‌های آلودگی کمتری نسبت به رقم‌های بومی داشتند. آلودگی روی رقم Red Delicious نسبت به Golden Delicious در باغ‌های مخلوط، بیشتر بود. این مشاهده‌ها با توجه به قدمت رقم‌های مختلف در منطقه با سناریوی تکامل همزمان میزبان-بیمارگر (Stukenbrock & McDonald, 2008) مطابقت دارد. رقم‌های وحشی در طی سال‌های طولانی در این منطقه وجود داشته‌اند و نسبت به رقم‌های بومی و تجاری قدمت بیشتری دارند. بنابراین بیمارگر با گذر زمان سازگاری بیشتری با میزبان قدیمی خود برقرار کرده است. رقم‌های بومی که از اهلی‌سازی رقم‌های وحشی به‌دست آمده‌اند به لحاظ قدمت در وهلهٔ دوم قرار می‌گیرند. میزان آلودگی به بیماری نیز روی این رقم‌ها در مقایسه با سایر رقم‌های با این قدمت مطابقت دارد. درنهایت رقم‌های تجاری هستند که در سال‌های اخیر در این مناطق کشت شده‌اند و میزان آلودگی به بیمارگر روی این رقم‌ها سناریوی فوق را تائید می‌کند.

از بین ۲۸ جایگاه ریزماهواره تکثیرشده، ۱۸ نشانگر در بین جدایه‌ها و جمعیت‌ها چندشکل بودند و نُه نشانگر (vitc2/16، vitg9/99، Viaggt8/1، vica10/154، Vitc1/82، viga3/z، viaacs10، vigt8/146 و 1aac4h) که تنوعی بین جدایه‌ها نشان ندادند، تجزیه‌وتحلیل نشدند. نشانگر vitcca7/p نیز در تعدادی از نمونه‌ها تکثیر نشد و بنابراین در تجزیه‌وتحلیل داده‌ها بررسی نشد. تجزیه‌وتحلیل داده‌های حاصل از تکثیر ۱۸ جایگاه ریزماهواره در ۵۱ جدایهٔ قارچی حاصل از سه رقم مختلف سیب (رقم‌های وحشی، بومی و تجاری) در شمال کشور (سه استان گلستان، گیلان و مازندران) نشان داد، ناخالصی (هتروزیگوسیتی) مشاهده شده ($H_o$) در درون هر جمعیت بین ۰/۰۲ و ۰/۰۳ و به‌طور معنی‌داری کمتر از مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار ($H_e$) است (جدول ۲). با توجه به مقادیر به‌دست‌آمده برای هرکدام از شاخص‌های تنوع ژنی شامل تنوع ژنی Nei ($h_t$=۰/۲) و شاخص شانون ($I_t$=۰/۳) و همچنین تعداد

آلل‌های موجود در هر جمعیت (تعداد الل‌های مشاهده‌شده در جمعیت حاصل از رقم‌های وحشی= ۲/۳، رقم‌های بومی= ۳ و رقم‌های تجاری= ۲/۸) (جدول ۲)، تنوع درون جمعیت در جمعیت حاصل از رقم‌های بومی نسبت به رقم‌های وحشی و تجاری بیشتر است. جمعیت حاصل از رقم‌های تجاری نیز نسبت به رقم‌های وحشی تنوع بیشتری را نشان داده‌اند. رقم‌های وحشی به‌صورت تک-درخت‌های پراکنده در مناطق جنگلی و در ارتفاعات زیاد در حال رشد هستند و بنابراین به علت تراکم پوشش گیاهی در جنگل احتمال جریان ژنی از سایر میزبان‌های بومی و تجاری به این رقم‌ها کمتر است و این رقم‌ها بیشتر می‌توانند به‌عنوان منشأ قارچ باشند که بیمارگر از این میزبان‌ها (ارتفاع بالاتر از سایر میزبان‌ها) به سایر رقم‌ها در ارتفاعات پایین‌تر انتشار یابد و بدین ترتیب جریان ژنی بین این رقم‌ها رخ می‌دهد. بدین ترتیب، این جریان می‌تواند منجر به افزایش تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های روی رقم‌های بومی و تجاری نسبت به رقم‌های وحشی شود.

تجزیه‌وتحلیل واریانس مولکولی AMOVA نشان داد، ۹۷درصد تنوع درون جمعیت‌ها و تنها ۳درصد آن بین جمعیت‌ها پراکنده است (جدول ۳). میزان جریان ژنی کل ($N_m$) بین جمعیت‌ها ۱۴/۶ بود که درواقع این جریان ژنی باعث کاهش تنوع بین جمعیت‌ها و یکنواختی ژنتیکی بین جمعیت‌ها شده است. همچنین در بررسی ساختار جمعیت این قارچ در باغ‌های ایالت پنسیلوانیای امریکا توسط Zhang (2010) و تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری لکهٔ سیاه سیب در ایالت مینه‌سوتای امریکا توسط Clark (2014) تنوع ژنتیکی بیشتری درون جمعیت‌ها نسبت به تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها مشاهده شد. که این تنوع ژنتیکی زیاد درون جمعیت‌ها به دلیل تولیدمثل جنسی سالیانهٔ قارچ و همچنین جریان ژنی بین جمعیت‌ها رخ می‌دهد.

بر اساس میزان $F_{st}$=۰/۰۳ (P=۰/۰۱۴)، تمایز ژنتیکی بین سه جمعیت قارچ روی رقم‌های مختلف معنی‌دار بود. تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های حاصل از رقم‌های تجاری و سیب وحشی معنی‌دار بود. ولی جمعیت حاصل از رقم‌های بومی تمایز معنی‌داری با رقم‌های تجاری و همچنین وحشی نداشتند. در جمعیت حاصل از رقم‌های بومی جریان ژنی بیشتری با رقم‌های وحشی نسبت به رقم‌های تجاری نشان دادند (جدول ۴). همچنین تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) تائید کنندهٔ این نتایج است که مختصات اول و دوم، به ترتیب، ۱۱/۴ و ۱۰/۵۲ از تنوع ژنتیکی کل را نشان می‌دهند (شکل ۲).

دندروگرام UPGMA نیز این تمایز بین رقم‌ها را به‌خوبی نشان داد که جمعیت حاصل از رقم‌های بومی همراه با سیب وحشی در یک کلاد با فاصلهٔ ژنتیکی کمتری قرار گرفتند (شکل ۱).

جدول ۲. تعداد افراد هر جمعیت و شاخص‌های تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های *Venturia inaequalis*

Table 2. Sample size and various indexes of genetic diversities in different populations of *Venturia inaequalis*

| Population | Isolate No. | $N_a$ | h | I | $H_o$ | $H_e$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Wild apples | 20 | 2.30 | 0.16 | 0.24 | 0.03 | 0.30 |
| Iranian endemic cultivars | 20 | 3.00 | 0.22 | 0.34 | 0.03 | 0.40 |
| Commercial cultivars | 11 | 2.80 | 0.20 | 0.30 | 0.02 | 0.40 |
| Total | 51 | 3.44 | 0.20 | 0.30 | - | 0.39 |

$N_a$: تعداد الل، h: تنوع ژنی نِئی، I: شاخص شانون، $H_o$: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، $H_e$: هتروزیگوسیتی مورد انتظار.

$N_a$: total number of alleles, h: gene diversity (Nei), I: Shannon index, $H_o$: observed heterozygosity, $H_e$: expected heterozygosity.

جدول ۳. تجزیه‌وتحلیل واریانس مولکولی AMOVA برای سه جمعیت قارچ *Venturia inaequalis* روی رقم‌های مختلف سیب در شمال ایران

Table 3. Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) of *Venturia inaequalis* in three populations on different apple cultivars in the North of Iran

| Source of variation | Degrees of freedom | Sum of squares | Percentage of variation |
|---|---|---|---|
| Among population from different cultivars | 2 | 23.016 | 3 |
| Within population | 48 | 353.141 | 97 |
| Total | 50 | 376.157 | 100 |

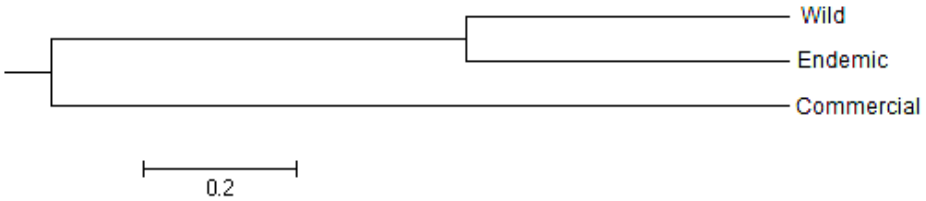
این نتایج نیز با قدمت و روابط تکاملی میزبان ارتباط مستقیم دارد، چراکه رقم‌های وحشی منشأ رقم‌های بومی هستند و رقم‌های تجاری در وهلهٔ بعد از رقم‌های بومی منشأ گرفتند. که درواقع این نتایج با فرضیهٔ ژن برای ژن و سازگاری بیمارگر به میزبان مطابقت دارد. همچنین، در رقم‌های بومی و به‌ویژه در رقم‌های تجاری استفاده از سموم قارچ‌کش نیز در شکسته شدن مقاومت و غلبهٔ بیمارگر بر میزبان تأثیرگذار است. با مطالعه و ردیابی ژن‌های مقاومت در رقم‌های مختلف میزبان می‌توان به ارتباط و اختصاص جدایه‌های قارچی با میزبان و تمایز آن بین رقم‌های مختلف سیب (حضور نژادهای خاص روی رقم‌های مختلف) پی برد. همچنین با انجام مطالعات بیماریزایی جدایه‌های حاصل از رقم‌های خاص روی سایر رقم‌ها، اختصاص جدایه‌ها به رقم‌های سیب مشخص خواهد شد. Passey *et al.* (2015) تمایز بین جمعیت‌های این بیمارگر را روی رقم‌های مختلف سیب (درختان سیب ۴۰ تا ۴۵ ساله) در باغ‌های مخلوط در انگلستان و در زمان‌های مختلف با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بررسی کردند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، دو جمعیت قارچ جمع‌آوری شده در دو سال متفاوت (به فاصلهٔ شش یا هفت سال) تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند. در یکی از باغ‌ها تفاوت معنی‌داری بین جمعیت‌های قارچ به‌دست‌آمده از روی رقم‌های مختلف مشاهده شد. این مطالعه تخمین زد که تمایز بین جمعیت‌های قارچ روی رقم‌های مختلف در باغ‌های مختلف درگذر زمان کاهش پیدا و این نشان می‌دهد، یک نژاد برتر (super race)، در صورت وجود، در طی این مدت روی این رقم‌ها غالب نشده است. این نشان می‌دهد، باغ‌های مخلوط می‌تواند نقش مؤثری در کنترل این بیماری داشته باشد. چراکه مدت‌زمان زیادی جهت تغییر و غالبیت نژاد خاص در این باغ‌ها مورد نیاز است.

Guerin *et al.* (2007) جدایه‌های *V. inaequalis* را از روی رقم‌های دارای ژن مقاومت *Vf* و رقم‌های فاقد این ژن جمع‌آوری و با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بررسی کردند. نتایج آنان تمایز معنی‌داری بین این دو جمعیت نشان داد که این جمعیت‌ها حاصل از غلبهٔ بیمارگر بر ژن‌های عامل مقاومت و بسط جمعیت روی میزبان می‌باشند. مطالعات Xu *et al.* (2008) تمایز بین جمعیت‌های حاصل از روی رقم‌های مختلف در یک باغ در انگلیس را نشان داد، درحالی‌که جمعیت‌های حاصل از روی رقم‌های مختلف سیب در چین چنین تمایزی را نشان ندادند که این نتایج با قدمت کوتاه‌مدت کشت سیب در ایالت Shaanxi چین (کشت و گسترش سیب در این منطقه از دهه ۱۹۸۰ آغاز شده است) قابل توجیه است، زیرا درواقع بیمارگر زمان کافی برای سازگاری با رقم‌ها در این منطقه نداشته است.

جدول ۴. تمایز ژنتیکی ($F_{st}$) (پایین قطر میانی) و جریان ژنی ($N_m$) (بالای قطر میانی) بین جمعیت‌های *Venturia inaequalis* روی رقم‌های مختلف سیب در شمال ایران

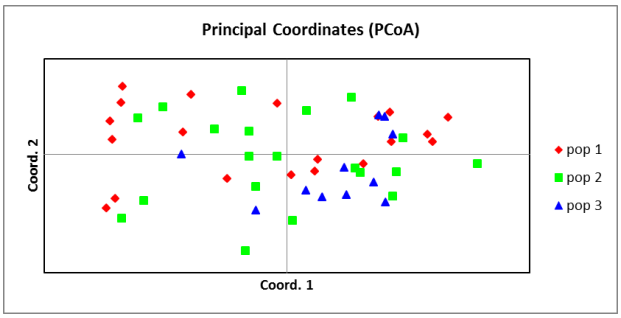
Table 4. Pairwise $F_{ST}$ and $N_m$ calculated with GeneALex for *Venturia inaequalis* populations on different apple cultivars in the North of Iran. $F_{ST}$ values below diagonal

| Population | Wild apples | Iranian endemic | Commercial |
|---|---|---|---|
| Wild apples | ** | 31.177 | 5.412 |
| Iranian endemic | 0.016 (P=0.16) | ** | 30.626 |
| Commercial | 0.085 (P=0.002) | 0.016 (P=0.165) | ** |




شکل ۱. دندروگرام UPGMA رسم شده بر اساس فاصلهٔ ژنتیکی Nei بین سه جمعیت قارچ *Venturia inaequalis* (۵۱ جدایهٔ قارچی) روی رقم‌های مختلف سیب در شمال ایران با استفاده از نرم‌افزار Popgene.

Figure 1. UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance between three *Venturia inaequalis* populations (51 fungal isolates) on different apple cultivars in the North of Iran using Popgene software




شکل ۲. PCoA. مختصات اول = ۱۱/۴ و مختصات دوم = ۱۰/۵۲. Pop 1: جدایه‌های جمع‌آوری شده از روی سیب وحشی، Pop 2: جدایه‌های مربوط به رقم‌های بومی ایران و Pop 3: جدایه‌های حاصل از رقم‌های تجاری

Figure 2. PCoA. Coordinate 1 = 11.4, Coordinate 2 = 10.52. Pop 1: wild apple; Pop 2: Iranian endemic cultivars; Pop 3: commercial cultivars

در این مطالعه مشاهده‌های مربوط به مرحلهٔ نمونه‌برداری قارچ عامل بیماری روی رقم‌های مختلف سیب در شمال کشور و نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره قارچ بیمارگر نشان می‌دهند که این بیمارگر به‌مدت طولانی و قبل از اهلی‌سازی درختان سیب در ایران وجود داشته است و توانسته در طی زندگی درازمدت با میزبان قدیمی خود (رقم‌های وحشی سیب) بر ژن‌های مقاومت موجود در میزبان غلبه کند. که درواقع آلودگی صد درصد این رقم‌ها در مناطق جنگلی نشان‌دهندهٔ این حقیقت است. از طرفی با توجه به نتایج حاصل از مطالعهٔ Gharghani *et al.* (2009) که سیب بومی ایران را به‌عنوان حدواسط در اهلی‌سازی و گسترش سیب در جهان معرفی کرده‌اند و همچنین مطالعات Gladieux *et al.* (2008) که ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ عامل بیماری لکه سیاه را در جهان بررسی و نتایج آن‌ها آسیای مرکزی را به‌عنوان منشأ این بیمارگر معرفی کرد، می‌توان با انجام مطالعات بیشتر در رابطه با ژن‌های مقاومت در میزبان و ارتباط بین این ژن‌ها با ساختار ژنتیکی جمعیت قارچ روی این رقم‌ها و همچنین بررسی وسیع‌تر ساختار ژنتیکی در سطح ایران و کشورهای آسیای مرکزی به منشأ این بیماری پی برد. چراکه بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه و همچنین سناریوی تکامل همزمان میزبان- بیمارگر، احتمال منشأ گرفتن این بیماری از رقم‌های وحشی در ایران وجود دارد.

## REFERENCES


1. Ashkan, S. M. (2011). *A textbook of fruit crops diseases in Iran*. Aeeizh, 472 pp, Tehran, Iran. (in Farsi)
2. Boehm, E. W. A., Freeman, S., Shabi, E. & Michailides, T. J. (2003). Microsatellite primers indicate the presence of asexual populations of *Venturia inaequalis* in coastal Israeli apple orchards. *Phytoparasitica*, 31(3), 236-251.
3. Bruce, A., McDonald, B. A. & Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 349-79.
4. Clark, M. D. (2014). *Characterizing the host response and genetic control of resistance in 'Honeycrisp' to apple scab (Venturia inaequalis)*. Ph. D. dissertation. University of Minnesota. 228 PP.
5. Ershad, D. (2009). *Fungi of Iran*. Iranian Research Institute of Plant Protection, 531 pp, Tehran, Iran. (in Farsi)
6. Guerin, F., Franck, P., Loiseau, A., Devaux, M. & Le Cam, B. (2004). Isolation of 21 new polymorphic microsatellite loci in the phytopathogenic fungus *Venturia inaequalis*. *Molecular Ecology Notes*, 4 (2), 268-270.
7. Guérin, F., Gladieux, P. & Le Cam, B. (2007). Origin and colonization history of newly virulent strains of the phytopathogenic fungus *Venturia inaequalis*. *Fungal Genetics and Biology*, 44, 284-292.
8. Gharghani, A., Zamani, Z., Talaie, A., Oraguzie, N. C., Fatahi, R., Hajnajari, H., Wiedow, C. & Gardiner, S. E. (2009). Genetic identity and relationships of Iranian apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars and landraces, wild Malus species and representative old apple cultivars based on simple sequence repeat (SSR) marker analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56, 829-842.

9. Gladieux, P., Zhang, X.-G., Afoufa-Bastien, D., Valdebenito Sanhueza, R.-M., Sbaghi, M., et al. (2008). On the origin and spread of the scab disease of apple: out of central Asia. *PLoS ONE* 3(1), e1455. doi:10.1371/journal.pone.0001455.
10. McDonald, B. A. (1997). The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology*, 87 (4), 448-453.
11. McDonald, B. A. & Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 349-79.
12. Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. (1st ed.). New York, USA: Columbia University Press.
13. Padder, B. A., Shah, M. D., Ahmad, M., Sofi, T. A., Ahanger, F. A. & Hamid, A. (2011). Genetic differentiation among populations of *Venturia inaequalis* in Kashmir: A north-western state of India. *Asian Journal of Plant Pathology*, 5, 75-83.
14. Passey, T. A. J., Shaw, M. W. & Xu, X.-M. (2015). Differentiation in populations of the apple scab fungus *Venturia inaequalis* on cultivars in a mixed orchard remain over time. *Plant Pathology*, Doi: 10.1111/ppa.12492.
15. Peakall, R. & Smous, P. E. (2012). GenALex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.
16. Ruszkiewicz-Michalska, M. & Połeć, E. (2006). The genus *Fusicladium* (Hyphomycetes) in Poland. *Acta Mycologica*, 41 (2), 285-298.
17. Stukenbrock, E. H. & McDonald, B. A. (2008). The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 75-100.
18. Schubert, K., Ritschel, A. & Braun, U. (2003). A monograph of *Fusicladium* s. lat. (Hyphomycetes). *Schlechtendalia*, 9, 1-132.
19. Tenzer, I., Degli Ivanissevich, S., Morgante, M. & Gessler, C. (1999). Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 89 (9), 748-753.
20. Xu, X., Yang, Y., Thakur, V., Roberts, A. & Barbara, D. (2008). Population variation of apple scab (*Venturia inaequalis*) isolates from Asia and Europe. *Plant Disease*, 92, 247-252.
21. Xu, X., Roberts, T., Barbara, D., Harvey, N. G., Gao, L. & 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.
22. Yeh, F. C., Yang, R. C. & Boyle T. (1999). POPGENE version 1.31., Microsoft Window-based Freeware for population genetic analysis. University of Alberta, Edmonton, Canada.
23. Zhang, L. (2010). Genetic diversity and temporal dynamics of *Venturia inaequalis* populations following two apple scab epidemics in Pennsylvania. Master thesis, The Pennsylvania State University, The Graduate School College of Agricultural Sciences. Available: https://etda.libraries.psu.edu/catalog/11414.