ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶
صفحه ۲۰۵ - ۱۹۵

تعیین گـــروه‌های سازگاری رویـــشـــی در جمعیت قارچ *Botrytis cinerae* با اســـتفاده از جهش یافته‌های *sul*

Determination of Vegetative Compatibility Groups (VCGs) in *Botrytis cinerea* populations using Sulfate non utilizing mutant (*sul*)

زهرا خلجی[۱]، وحید زرین نیا*[۲]، رضا عزیزی نژاد[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه گیاهپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه اصلاح نباتات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Khalaji Z[1], Zarrinnia V[*2], Azizinejad R[3]

1- MSc Student, Department of Agricultural Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Plant Breeding, Science and Research Branch , Islamic Azad University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Zarrinnia@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۷)

چکیده

در این تحقیق ساختار جمعیت قارچ (*Botrytis cinerea* (*tel: Botrytinia fakelianae*) از طریق بررسی گروه‌های سازگاری رویشی (VCG) با استفاده از جهش یافته‌های *sul* که قادر به استفاده از یون سولفات نیستند مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور ۲۶ جدایه قارچ *B.cinerea* از میزبان‌های صیفی و سبزی از گلخانه‌های منطقه ورامین جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از شناسایی، به منظور خالص‌سازی تک اسپور شده و روی محیط کشت اختصاصی BSM کشت شدند. به‌منظور بررسی گروه‌های سازگاری رویشی (VCG) جدایه‌ها، روی محیط کشت پایه Vogel's حاوی سدیم سلنات (یک تا سه گرم در لیتر) رشد داده شدند. سلنات یک ترکیب سمی و آنالوگ سولفات بوده و قارچ‌ها قادر به استفاده از آن نیستند. جهش یافتگان مقاوم به سلنات در این محیط به صورت سکتورهایی با رشد سریع که از حاشیه کلنی خارج شده بودند مشاهده شدند. جهش‌یافتگان سپس به‌منظور تأیید به محیط کشت پایه (MM:Minimmal Media) منتقل و خصوصیات رشدی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. جهش‌یافتگان اکسوتروفی که دارای رشد تنک روی محیط کشت پایه و دارای رشد وحشی روی محیط کشت پایه همراه با ال- متیونین بودند به‌عنوان جهش‌یافتگان *sul* تعیین شدند. پس از اطمینان از بروز جهش بر اساس الگوی رشد اکسوتروف روی محیط کشت پایه، جهش‌یافتگان *sul* به‌منظور تعیین فنوتیپ به محیط حاوی پتاسیم کرومات منتقل شدند. جدایه‌هایی که قادر به رشد روی این محیط بودند مقاوم به پتاسیم کرومات و در غیر این‌صورت حساس به پتاسیم کرومات تعیین فنوتیپ شدند. در نهایت به‌منظور تعیین گروه‌های سازگاری رویشی جهش یافتگان حساس به پتاسیم کرومات از یک جدایه در مقابل جهش یافتگان مقاوم به پتاسیم کرومات از جدایه دیگر قرار داده شد. محل تماس دو جدایه از نظر رشد پروتروفیک (نشان دهنده سازگاری) و یا وجود شکاف (نشان دهنده ناسازگاری) بعد از یک‌ماه مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌هایی که در محل تماس رشد پروتروفیک از خود نشان دادند، سازگار و در یک گروه سازگاری رویشی قرار داده شدند. در نهایت از مجموع ۲۶ جدایه مورد بررسی تعداد ۱۵ گروه سازگار رویشی تعیین شد، گروه‌های سازگاری رویشی با نوع میزبان و مناطق جمع‌آوری شده همبستگی نداشتند.

واژه‌های کلیدی

بیماری‌زایی
جهش‌یافته
گروه‌های سازگاری رویشی
Botrytise cinerea

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.5.7]

مقدمه

بیماری کپک خاکستری توسط قارچ (*Botryotinia fukelinia* (tel: *Botrytise cinerea* ایجاد می‌شود. این بیماری یکی از مهم‌ترین بیماری‌های پس از برداشت در محصولات سبزی و صیفی در ایران به حساب می‌آید (Elad et al. 2004) مطالعه جمعیت با استفاده از گروه‌های سازگاری رویشی (VCG) به عنوان ابزار اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچ‌ها در سال‌های اخیر گسترش یافته است. گروه‌های سازگاری رویشی نه تنها برای تعیین تنوع در ساختار جمعیت بسیاری از قارچ‌ها استفاده می‌شود بلکه در بعضی موارد ارتباط بین گروه‌های سازگاری رویشی با بیماریزایی در یک میزبان خاص نیز مشاهده شده است (Correll 1991). تعیین گروه‌های سازگاری رویشی (VCGs) یک ابزار مفید جهت تجزیه و تحلیل جمعیت‌های قارچی و یک ابزار مطالعاتی جهت اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی می‌باشد. در واقع از روش تعیین گروه‌های سازگاری رویشی می‌توان به‌عنوان یک نشانگر برای نشان دادن اختلافات ژنتیکی درون یک گونه استفاده نمود. سازگاری رویشی با عنوان سازگاری هتروکاریونی نیز شناخته می‌شود (Leslie 1993). سازگاری رویشی در ساده‌ترین صورت به این معنی است که دو هیف می‌توانند با هم آمیخته شوند و پس از تبادل هسته‌ها، تشکیل یک هتروکاریون پایدار دهند. بر این اساس، جدایه‌هایی که از لحاظ رویشی سازگار بوده و با یکدیگر تشکیل هتروکاریون های پایدار می‌دهند در یک گروه با عنوان گروه سازگاری رویشی قرار می‌گیرند (Correll et al. 1986; Leslie 1993 ; Woo et al. 1996). اساس ژنتیکی سازگاری و ناسازگاری رویشی، در قارچ‌های ریسه‌ای آسکومیستی به‌وسیله ژن‌گاه‌های (vegetative incompatibility) vic و یا het (heterokaryon incompatibility) که به‌ترتیب کنترل کننده سازگاری رویشی و یا ناسازگاری هتروکاریونی هستند به‌صورت اللیک و غیر اللیک کنترل می‌شود (Khodaparast 1392). جدایه‌هایی که دارای الل‌های یکسان در تمام جایگاه‌های ژنی vic هستند امکان تشکیل هتروکاریون پایدار را دارا می‌باشند. در غیر این صورت، هتروکاریون حاصل از رشد باز می‌ماند، که در طبیعت این فرایند به‌صورت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی شناخته می‌شود (Jin and Reed 2002; Koonin and Aravind 2002). از آنجایی‌که واکنش‌های سازگاری یا ناسازگاری بین جدایه‌ها به‌صورت ظاهری قابل مشاهده نیست، جهش‌یافتگان *sel* که قادر به مصرف سلنات نمی‌باشد، جهت تشخیص گروه‌های سازگاری رویشی معرفی شده‌اند. جهش‌یافتگان *sul* نیز در محیط حاوی سلنات انتخاب می‌شوند. سلنات به‌عنوان آنالوگ سولفات عمل کرده و به‌وسیله آنزیم احیا‌کننده سولفات به ماده سمی سلنیت تبدیل میشود. بدین‌ترتیب جهش‌یافتگان مقاوم به سولفات که دارای نقص ژنتیکی در زمینه ساخت آنزیم احیاکننده سلنات هستند، در قالب قطاع‌های سریع الرشد از روی محیط حاوی سلنات قابل جداسازی می‌باشند. این جهش‌یافتگان روی محیط کشت حداقل که به‌عنوان تنها منبع سولفات است، رشد ضعیف، گسترده و تقریباً بدون اسپورزایی و میسیلیوم هوائی از خود نشان می‌دهند. این رشد ضعیف به‌دلیل عدم توانائی قارچ جهش‌یافته *sul* بر مصرف سلنات به‌عنوان تنها منبع سولفات است. برای تعیین گروه‌های سازگاری رویشی، جهش یافتگان *sul* بر روی محیط کشت حداقل (MM= Minimal medium) با یکدیگر مقابله داده می‌شوند. جهش‌یافتگانی که قادر به تشکیل هتروکاریون پایدار با یکدیگر باشند در یک VCG قرار می‌گیرند. چنین حالتی دلیل بر تشکیل هتروکاریون و در نتیجه تشابه ژنتیکی دو جدایه است (Puhalla 1985). بر این اساس جدایه‌هایی که از لحاظ رویشی سازگار بوده و با یکدیگر تشکیل هتروکاریون‌های پایدار می‌دهند در یک گروه با عنوان گروه سازگاری رویشی قرار می‌گیرند (Correll et al. 1986; Leslie 1993;Woo et al. 1996). مطالعات نشان داده است که بین گروه‌های سازگاری رویشی و مناطق جغرافیایی در قارچ‌های مختلف ارتباطی بسیار پیچیده وجود دارد چنان‌که در مواردی می‌توان همبستگی مثبت بین این دو مشاهده نمود (Puhalla 1984). یک روش طبقه‌بندی بر اساس سازگاری رویشی جدایه‌های بیماریزایی *F.oxysporum* پیشنهاد شده که در این روش ارتباطی بین جدایه‌های یک فرم اختصاصی و گروه سازگاری رویشی نشان داده شده‌است. بر اساس این روش مکان ژنی vic (کنترل کننده سازگاری رویشی) و ژن‌گاه‌هایی که بیماری‌زایی را کنترل می‌کند، پیوستگی نزدیکی با یکدیگر دارند (Puhalla 1985). این روش معیار مناسبی برای گروه‌بندی جدایه‌ها و بررسی تنوع ژنتیکی می-

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.5.7]

باشد (Puhalla and spieth 1985; Kistler et al. 1987). هدف از این مطالعه، بررسی گروه‌های سازگاری رویشی در جدایه‌های قارچ *B.cinerea* عامل بیماری پوسیدگی یا کپک خاکستری و ارتباط آن با خصوصیات بیماری‌زایی، مناطق جغرافیایی و میزبان در جدایه‌های مورد بررسی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری در سال زراعی ۱۳۹۳، از گلخانه‌های منطقه ورامین و حومه آن شامل محمد آباد، قلعه سین، فلات ورامین و جواد آباد انجام شد. برای این منظور پس از بازدید از گلخانه‌ها در هر خط کشت تک تک بوته‌های هرس شده بررسی و از ناحیه ساقه، برگ و میوه‌های آلوده نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌ها در پاکت-های مخصوص نگه‌داری و روی پاکت‌ها نام محصول، گل‌خانه و سایر مشخصات نمونه‌ها نوشته شده و در یخچال نگهداری شد و برای کشت و جداسازی عامل بیماری به آزمایشگاه منتقل شد.

پس از انتقال ساقه، برگ و میوه‌های آلوده‌ای که علائم بیماری کپک خاکستری در آن‌ها نمایان بود جداسازی قارچ عامل بیماری به‌طور مستقیم و از طریق انتقال اسپورهای قارچ از روی بافت آلوده به محیط کشت PDA (سیب‌زمینی – دکستروز – آگار) صورت گرفت. به‌منظور تأیید قارچ *B. cinerea* پس از بررسی خصوصیات میکروسکپیک و ماکروسکپیک (Mirzaei et al. 2002) از محیط کشت اختصاصی (*Botrytis selective medium*) BSM استفاده شد (Edwards and Seddon 2001). در روش استفاده از محیط کشت اختصاصی BSM هر جدایه از قارچ *B. cinerea* با فاصله سه سانتی‌متر از یک قارچ شاهد که در این تحقیق یک جدایه از قارچ *Alternaria sp.* بود و از کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران تهیه شده بود قرار داده می‌شود. عدم رشد قارچ *Alternaria sp.* و رشد قارچ *B. cinerae* بیانگر صحیح بودن روند شناسایی و تأیید گونه *B. cinerae* است (Edwards and Seddon 2001). به‌منظور خالص سازی جدایه‌های قارچی شناسایی شده نیز ابتدا هر جدایه روی محیط کشت PDA (سیب زمینی – دکستروز – آگار) کشت شد. پس از آنکه جدایه‌ها سطح ظروف پتری را به‌طور کامل فرا گرفتند تحت اشعه فرابنفش با طول موج ۴۰۰-۳۱۵ نانومتر در فاصله ۲۰ سانتی‌متر از سطح نمونه‌ها قرار گرفته و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بر آن‌ها اعمال شد تا جدایه‌ها برای تولید اسپور تحریک شوند. پس از اینکه همه جدایه‌ها به میزان کافی اسپور تولید کردند عملیات خالص سازی به روش تک اسپور انجام شد. بدین صورت که از هر جدایه ۱۰۰ اسپور کشت و در نهایت پس از بررسی الگوی پرگنه‌ها یک پرگنه به‌عنوان نماینده برای هر جدایه انتخاب شد. در نهایت از هر جدایه دو نمونه یکی برای انجام کارهای معمولی آزمایشگاهی و یکی برای نگهداری طولانی مدت انتخاب شد. برای نگهداری طولانی مدت نیز جدایه‌ها به‌صورت کشت مورب و تحت گلیسیرین ۴۰ درصد و در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Nielsen 2000).

در این تحقیق به‌منظور بررسی گروه‌های سازگاری رویشی از محیط کشت حداقل ووگل استفاده شد (Korolev et al. 2006; Vogel 1964). از این محیط به‌عنوان محیط پایه در ساخت سایر محیط‌های کشت از جمله محیط مورد نیاز برای تعیین گروه‌های سازگاری رویشی، ایجاد جهش یافته‌های *sul* و *sel* و نگهداری جهش‌یافتگان، تعیین فنوتیپ جهش یافتگان و هم‌چنین آزمون مکمل سازی استفاده شد (Correll et al. 1987). قابل ذکر است که پس از تهیه محیط کشت پایه و قبل از اضافه کردن ترکیبات فرعی (تریس المنت‌ها و بیوتین) محیط کشت حاصله در فشار یک اتمسفر و در دمای۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه درون اتوکلاو ضد عفونی و پس از سرد شدن، عناصر فرعی به محیط اضافه شد.

این محیط کشت با افزودن سدیم سلنات (Na_2O_4Se) و تائورین، (Nc2H7So3، ۱۰۰ میلی‌گرم) به یک لیتر محیط پایه ووگل تهیه و پس از استریل شدن برای تولید جهش‌یافتگان *sel* استفاده شد (Korolev et al. 2006 ; Correl et al. 1987). از آنجایی‌که جدایه‌های مختلف در غلظت‌های متفاوت سلنات سدیم تولید قطاع‌های سریع الرشد (جهش‌یافته) نمودند لذا در این تحقیق از سه غلظت ۱، ۳ و ۵ گرم در لیتر سلنات سدیم برای تولید جهش-یافته‌ها استفاده شد. به‌منظور تولید جهش‌یافتگان *sel* قطعاتی از هر جدایه قارچ *B. cinerea* به قطر پنج میلی‌متر روی این محیط قرار داده شد. محیط‌های کشت حاوی قارچ در انکوباکتور، در دمای

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.5.7]

۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شد. در طی این مدت ظروف پتری مرتباً از نظر تولید قطاع‌های سریع الرشد (میسلیوم‌های پر رشدی که از حاشیه کلنی‌ها خارج می‌شدند) بررسی شدند. محیط حاوی سلنات سمی و جلوگیری کننده از رشد بوده و برای قارچ سمی است. لذا میسلیوم‌های جدایه‌های تیپ وحشی قادر به رشد در این محیط نبوده و یا رشد بسیار محدودی را از خود نشان می‌دهند. در عوض سلول‌های جهش یافته‌ای که در ژن و یا ژن‌های مسیر بیوشیمیایی مصرف سولفات آن‌ها جهش رخ داده باشد قادر به تبدیل سلنات به سلنیت نبوده و از حاشیه کلونی به‌صورت میسلیوم‌هایی با رشد سریع نمایان می‌شوند. این میسلیوم‌ها همان قطاع‌های سریع الرشد بوده و معمولاً بعد از گذشت ۳ تا ٤ هفته از حاشیه پرگنه‌ها خارج و به وضوح از سایر قسمت‌های پرگنه قابل تمایز می‌باشند. قطاع‌های سریع الرشدی که در این محیط ایجاد شدند سپس برای تأیید جهش‌یافتگی به محیط کشت پایه انتقال داده شدند. قطاع‌های سریع الرشدی که در محیط پایه، فنوتیپ کم پشت و یا اصطلاحاً رشد تنک از خود نشان دادند به‌عنوان جهش‌یافته تعیین شده و برای انجام سایر مراحل آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند (Korolev et al. 2008).

برای تعیین فنوتیپ جهش یافتگان *sel* از محیط کشت حداقل و محیط کشت حداقل حاوی L-methionine با غلظت ۰/۵ گرم در لیتر استفاده شد. برای این منظور از حاشیه پرگنه‌های جدایه‌های جهش‌یافته مرحله قبل قطعاتی به قطر پنج میلی‌متر به محیط حداقل (MM) و محیط حداقل حاوی L-methionine انتقال و سپس محیط‌های کشت حاوی قارچ به انکوباتور منتقل و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. پس از گذشت ۱۵ تا ۲۰ روز جدایه‌ها از نظر الگوی رشدی در هر دو محیط مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌هایی که در محیط حداقل فنوتیپ رشد تنک و در محیط حداقل حاوی L-methionine رشد وحشی از خود بروز دادند به‌عنوان جهش‌یافتگان *sul* در نظر گرفته شدند (Leslie and Summerell 2006).

به‌منظور تعیین فنوتیپ جهش یافته‌های *sul*، تمامی جهش یافتگان در محیط حداقل حاوی پتاسیم کرومات (یک گرم در لیتر) و L-methionine (۰/۰٤ گرم در لیتر) کشت داده شدند. ظروف پتری حاوی قارچ سپس به انکوباتور منتقل و در دمای۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۵ تا ۳۰ روز نگهداری شد. جدایه‌هایی که روی این محیط قادر به رشد بودند با فنوتیپی مقاوم به پتاسیم کرومات و جدایه‌هایی که قادر به رشد روی این محیط نبودند با فنوتیپ حساس به پتاسیم کرومات تعیین فنوتیپ شدند (Weed et al. 1998).

تمامی جهش‌یافته‌های *sul* به‌دست آمده از هر جدایه برای آزمون مکمل سازی[1] انتخاب شدند. این جهش‌یافته‌ها از نظر امکان تلاقی و تکمیل یکدیگر مورد آزمایش گرفتند. برای انجام این آزمون از محیط کشت حداقل استفاده شد. برای این منظور ابتدا از حاشیه پرگنه‌های جوان قطعاتی به قطر پنج میلی‌متر جدا و به یک ظرف پتری حاوی محیط کشت حداقل منتقل و در تمامی حالات ممکنه با سایر جهش یافته‌های به‌دست آمده از همان جدایه‌ها تلاقی داده شد. ظروف پتری حاوی قارچ در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور و در تاریکی نگهداری شدند. بعد از گذشت ۲۵ تا ۳۰ روز محل تماس دو جدایه از نظر حضور و یا عدم حضور رشد پروتوتروفیک مورد ارزیابی قرار گرفت. جهش‌یافته‌هایی که در محل خط تلاقی واکنش ناسازگاری از خود بروز دادند از ادامه آزمایش حذف شدند. در این مرحله از حاشیه پرگنه‌های جوان جهش‌یافته که قبلاً به‌عنوان مقاوم و یا حساس به کرومات پتاسیم تعیین فنوتیپ شده بودند قطعاتی به قطر پنج میلی‌متر انتخاب و به ظروف پتری حاوی محیط حداقل منتقل شدند. قطعات حاصل از حاشیه پرگنه جهش‌یافته‌های مقاوم و یا حساس به پتاسیم کرومات در تمامی حالات ممکنه با یکدیگر تلاقی داده شدند. رشد پروتوتروف در خط محل تلاقی دو جهش‌یافته به‌عنوان معیاری برای سازگاری رویشی و وجود شکاف و یا رشد کم پشت میسلیومی در محل خط تلاقی دو جدایه نشان‌دهنده ناسازگاری رویشی در نظر گرفته شد. در نهایت بر اساس سازگاری و یا ناسازگاری جدایه‌ها با یکدیگر گروه‌های سازگاری رویشی تعیین شدند (Beever and Parker 2003). به‌منظور آماده سازی مایه تلقیح، ابتدا هر جدایه به محیط سیب‌زمینی – دکستروز – آگار (PDA) انتقال و پس از آنکه جدایه‌ها سطح ظروف پتری را به‌طور کامل فرا گرفتند به‌منظور تحریک جدایه‌ها

[1] Complement test

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.5.7]

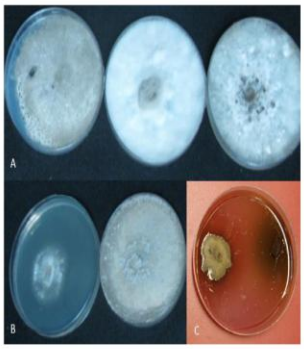
به اسپورزایی تحت اشعه فرابنفش (طول موج ۴۰۰-۳۱۵ نانومتر) که لامپ آن در فاصله ۲۰ سانتی‌متر از سطح نمونه‌ها قرار داشت به مدت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شدند. به‌منظور تهیه سوسپانسیون اسپوری جدایه‌های قارچی که به مرحله اسپوردهی رسیده بودند به‌وسیله اسکالپل تکه تکه شده و درون ۵۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر استریل وارد و به‌خوبی هم زده شدند. سوسپانسیون حاصل از لحاظ تعداد اسپور توسط لام هماسیتومتر مورد بررسی قرار گرفت تا غلظت اسپورها به میزان ۴×۱۰^{۶} اسپور در میلی‌لیتر به ازای هر جدایه باشد.

برای تست مایه‌زنی از روش برگ‌های جدا شده و از میزبان لوبیا سفید (*phaseolus vulgarisg*) رقم درسا که بذور اصلاح شده آن از ایستگاه تحقیقاتی خمین تهیه شد استفاده شد. بذور را به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در آب خیسانده، بعد از مشاهده جوانه‌های کوچک بر روی بذور و اطمینان از رشدشان، درون گلدان‌های حاوی خاک مرغوب کشت شدند و در شرایط گلخانه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نور کافی، به مدت دو هفته تا رسیدن به مرحله پنج برگی نگه‌داری شدند. برای مایه‌زنی برگ‌های سالم پس از جدا شدن از میزبان در یک پتری حاوی لایه نازکی از محیط کشت سیب‌زمینی – دکستروز – آگار (PDA) قرار داده شدند. سپس با کمک یک سمپلر مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور روی سطح برگ و در سه نقطه لکه‌گذاری شد. برگ‌های تلقیح شده به انکوباتور منتقل و در دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار داده شدند. علایم حاصل از بیماری ۴۸ ساعت پس از تلقیح مورد بررسی قرار گرفت و از قطر هر لکه به‌صورت روزانه یادداشت برداری صورت پذیرفت. این کار تا هفت روز پس از تلقیح و تا زمانی که زخم‌ها روی سطح برگ به هم رسیدند ادامه یافت. با اندازه‌گیری میانگین قطر محل نکروزه برای تمامی جدایه‌ها می‌توان توان بیماری‌زایی جدایه‌ها را تعیین نمود. این آزمایش در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و تجزیه‌های آماری در سطح احتمال پنج درصد با نرم‌افزار SPSS صورت گرفت. هم‌چنین به‌منظور دسته‌بندی خوشه‌ای جدایه‌ها بر مبنای توان بیماری‌زایی از نرم-افزار NTSYS pc ver 2/02 استفاده شد.

نتایج

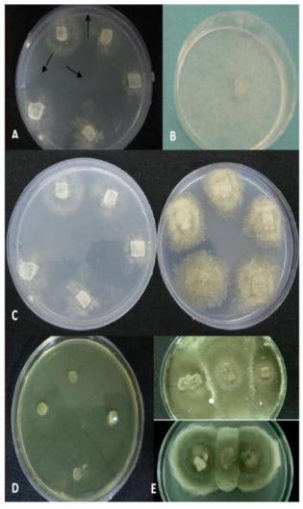
پس از جداسازی قارچ از اندام‌های گیاهی آلوده به بیماری کپک خاکستری خصوصیات ریخت‌شناسی میکروسکپیک و ماکروسکپیک قارچ مورد مطالعه قرار گرفت. از نظر خصوصیات ماکروسکپیک پرگنه‌های این قارچ عموماً رشد سریع داشته، میسیلیوم‌های هوایی فراوان و کرکی شکل و به رنگ سفید تا خاکستری رنگ تولید می‌نمودند. خصوصیات میکروسکپیک جدایه‌های مورد مطالعه به‌منظور شناسایی قارچ مورد ارزیابی قرار گرفت. تأیید گونه جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق نیز با استفاده از محیط کشت اختصاصی (*Botrytis selective medium*) BSM صورت گرفت (Edwards and Seddon 2001). رشد قارچ *B. cinerea* در مقایسه با عدم رشد قارچ شاهد *Alternaria sp.* در محیط کشت BSM تأییدکننده گونه قارچ *B.cinerea* بود (شکل ۱) در نهایت پس از انجام مراحل فوق ۲۶ جدایه از قارچ *B. cinerea* جداسازی و شناسایی شد (جدول ۱) و برای انجام سایر مراحل تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. سرعت رشد قطاع‌های سریع الرشد مقاوم به سلنات سدیم و هم-چنین زمان ایجاد این قطاع ها در اطراف پرگنه‌های انتقال یافته به محیط حداقل حاوی سلنات سدیم متفاوت بود. در بعضی جدایه-ها (BC-1 , BC-7) قطاع‌های سریع الرشد، حدود ۱۲ تا ۱۴ روز پس از کشت و در مابقی پس از گذشت ۲۵ تا ۳۰ روز شکل گرفتند (شکل ۲). در مجموع از ۲۶ جدایه مورد بررسی در این تحقیق و در ۳ غلظت ۱ ، ۳ و ۵ گرم در لیتر سلنات سدیم ۲۰۰ قطاع سریع الرشد حاصل شد که تنها ۱۶۸ عدد از آن‌ها، جهش یافته بودند. به‌طور کلی ۹۴/۰۵ درصد از کل جدایه‌ها در غلظت یک گرم در لیتر و ۵/۹۵ درصد از جدایه‌ها نیز در غلظت سه گرم در لیتر تولید قطاع‌های سریع الرشد نمودند ولی در غلظت پنج گرم در لیتر تولید قطاع‌های سریع الرشد مشاهده نشد (شکل۲). برای تشخیص و تأیید جهش‌یافته‌های *sul*، تمامی جهش‌یافته‌های *sel* در محیط کشت حاوی محیط حداقل و محیط حداقل همراه با L-methionine کشت شدند. در نهایت از مجموع ۲۰۰ جدایه ۱۶۸ جهش‌یافته حاصل شد که همه آن‌ها جهش‌یافته *sul* تشخیص داده شدند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.5.7]



شکل ۱- A-B: تنوع مورفولوژیک پرگنه‌های قارچ B. cinerea روی محیط کشت PDA (سیب‌زمینی- دکستروز – اگار) C: الگوی رشد قارچ *B. cinerea* (سمت چپ) و قارچ *Alternaria sp.* (سمت راست) در محیط کشت اختصاصی(BSM).

تمامی جهش‌یافتگان *sul* به‌دست آمده از هر جدایه برای آزمون مکمل‌سازی انتخاب شدند، این جهش‌یافتگان از نظر توان تلاقی با یکدیگر و تکمیل هم از نظر ژنتیکی مورد آزمایش گرفتند. برای این منظور جهش‌یافته‌های مربوط به جدایه‌ها در تمامی حالات ممکنه با یکدیگر تلاقی داده شدند (شکل ۲). در مورد برخی جدایه‌ها در محل تلاقی جهش‌یافته‌ها، پس از آناستوموز، رشد سلول هتروکاریون اولیه متوقف شده و ادامه نیافت و در برخی دیگر در محل به هم رسیدن، ریسه‌های دو پرگنه ناسازگار از رشد باز مانده و یک ناحیه بدون رشد در آن‌ها باقی ماند. جهش‌یافته‌هایی از هر جدایه که در تلاقی با یکدیگر واکنش ناسازگاری از خود بروز دادند از ادامه آزمایش حذف شدند. این آزمایش به ازای هر جدایه سه بار تکرار شد و پس از اطمینان کامل از نوع واکنش بین جهش‌یافتگان سایر مراحل آزمون سازگاری رویشی ادامه یافت. از محیط حداقل حاوی پتاسیم کرومات به همراه ال- متیونین به‌منظور تعیین فنوتیپ جهش‌یافته‌های *sul* به‌دست آمده از ۲۶ جدایه مورد بررسی در این تحقیق استفاده شد (شکل۲). از مجموع ۱۶۸ جهش‌یافته *sul*، ۷۶/۲۹ درصد جدایه‌ها مقاوم به پتاسیم کرومات و ۲۳/۷ درصد حساس به پتاسیم کرومات تشخیص داده شدند. به‌منظور تعیین گروه‌های سازگاری رویشی، جهش‌یافتگان *sul* تعیین فنوتیپ شده در تمام حالات ممکنه با یکدیگر تلاقی داده شدند. در نهایت از مجموع ۲۶ جدایه مورد بررسی در این تحقیق ۱۵ گروه سازگاری رویشی تعیین شد (شکل ۳) و گروه سازگاری رویشی (VCG) دارای بیش‌ترین میزان فراوانی جدایه‌ها بود. هشت گروه از مجموع ۱۵ گروه سازگاری رویشی نیز تک عضوی بودند (جدول۲). ارزیابی علائم بیماری دو روز پس از مایه‌زنی آغاز و تا یک هفته ادامه یافت. علائم بیماری به‌صورت لکه‌های سر سنجاقی دو روز پس از مایه- زنی آشکار شد. در روزهای بعد این لکه‌ها به تدریج توسعه‌یافته و در مورد اکثر جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق پس از گذشت یک هفته لکه‌ها منجر به بلایت کل برگ شد. نتایج نشان داد که قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *B.cinerea* در سطح احتمال پنج درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول۳). پس از انجام آزمون مقایسه میانگین دانکن جدایه‌ها بر مبنای توان بیماری‌زایی در ۹ گروه بیماری‌زایی قرار گرفتند (شکل ٤). جدایه‌هایی که دارای بیش‌ترین قدرت بیماری‌زایی بودند در گروه یک قرار داشتند.



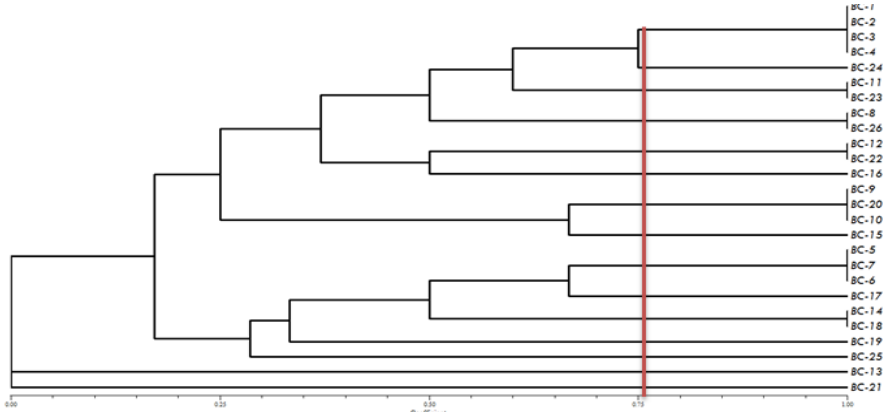
شکل ۲- A: قطاع‌های سریع الرشد جهش‌یافته‌های *sel* در محیط کشت حداقل (MM) حاوی سلنات سدیم B: الگوی رشد تنک جهش‌یافته‌های *sel* در محیط حداقل (MM). C: الگوی رشد جهش‌یافته‌های *sul* در محیط حداقل (سمت چپ) و الگوی رشد جهش‌یافته‌های *sul* در محیط حداقل دارای L.mithionin (سمت راست) D: فنوتیپ جهش‌یافته‌های *sul* در محیط حاوی پتاسیم کرومات. E: الگوی رشد پروتوتروف در محل خط تلاقی (تصویر بالا) و الگوی رشد ناسازگاری رویشی با ایجاد شکاف در محل خط تلاقی نشان داده شده‌است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.5.7]

جدول ۱- جدایه قارچ *B. cinerea* جمع‌آوری شده از میزبان‌های مختلف در شهرستان ورامین.

میزبان	نام قارچ	محل	جدایه	میزبان	نام قارچ	محل	جدایه
خیار	*B. cinerea*	پیشوا	BC-14	خیار	*B. cinerea*	محمدآباد –ورامین	BC-1
خیار	*B. cinerea*	پیشوا	BC-15	خیار	*B. cinerea*	جواد آباد–ورامین	BC-2
خیار	*B. cinerea*	محمدآباد –ورامین	BC-16	خیار	*B. cinerea*	پیشوا	BC-3
خیار	*B. cinerea*	پیشوا	BC-17	خیار	*B. cinerea*	پیشوا	BC-4
خیار	*B . cinerea*	پیشوا	BC-18	خیار	*B . cinerea*	پیشوا	BC-5
خیار	*B . cinerea*	پیشوا	BC-19	خیار	*B . cinerea*	پیشوا	BC-6
خیار	*B. cinerea*	پیشوا	BC-20	بادمجان	*B. cinerea*	فلات ورامین	BC-7
خیار	*B. cinerea*	پیشوا	BC-21	خیار	*B. cinerea*	پیشوا	BC-8
خیار	*B. cinerea*	پیشوا	BC-22	خیار	*B. cinerea*	پیشوا	BC-9
خیار	*B. cinerea*	امامزاده عون–ورامین	BC-23	خیار	*B. cinerea*	پیشوا	BC-10
خیار	*B. cinerea*	پیشوا	BC-24	گوجه‌فرنگی	*B. cinerea*	ورامین	BC-11
خیار	*B. cinerea*	محمدآباد –ورامین	BC-25	خیار	*B. cinerea*	پیشوا	BC-12
گوجه‌فرنگی	*B. cinerea*	جواد آباد–ورامین	BC-26	بادمجان	*B. cinerea*	فلات –ورامین	BC-13



شکل ۳- دندروگرام به‌دست آمده از گروه‌بندی سازگاری رویشی، در اثر تلاقی دادن جدایه‌های جهش‌یافته *sul* و ایجاد هتروکاریون پروتوتروف در جمعیت قارچ *B.cinerea* با استفاده از روش UPGMA، براین اساس با استفاده از ضریب coefficient به ۱۵ گروه سازگاری رویشی طبقه‌بندی شد.

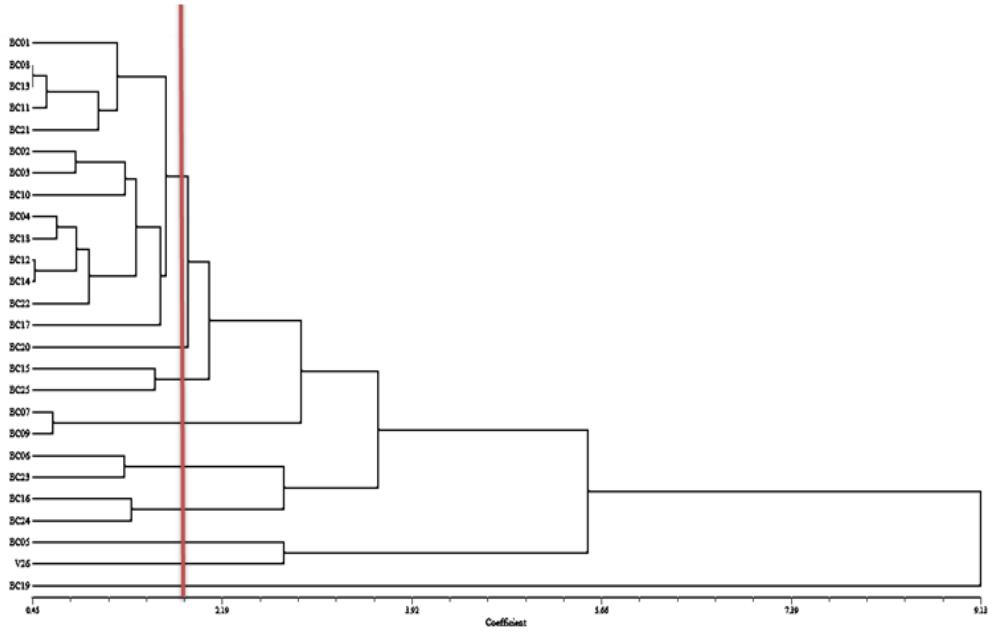
جدول ۲- فراوانی گروه‌های سازگاری رویشی (VCG) در ۲۶ جدایه قارچ *B.cinerea*

ساز گاری رویشی	جدایه	فراوانی٪
VCG 1	BC-1،BC-2، BC-3 ، BC-4	15.38
VCG 2	BC-24	3.84
VCG 3	BC-11 ، BC-23	7.69
VCG 4	BC-26،BC-8	7.69
VCG 5	BC-12 ، BC-22	7.69
VCG 6	BC-16	3.84
VCG 7	BC-9،BC-10 ، BC-20	11.53
VCG 8	BC15	3.84
VCG 9	BC-7،BC-5 ،BC-6	11.53
VCG 10	BC-17	3.84
VCG11	BC-14، BC-18	7.69
VCG 12	19 BC-	3.84
VCG13	BC-25	3.84
VCG14	BC-13	3.84
VCG15	BC-21	3.84

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.5.7]

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس توان بیماریزایی با استفاده از روش ANOVA در سطح ۰/۰۵

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معنی داری
جدایه	۲۵	۲۸۲/۰۲۶	۱۱/۲۸۱	۷/۸۳۲	۰/۰۰
زمان	۳	٤۷۱/۸۰	۱۵۷/۰٦۰	۱۰۹/۰٤۲	۰/۰۰
جدایه * زمان	۷۵	۸۵/۰۷٤	۱/۱۳٤	۰/۷۳۸	۰/۸۸٤
خطا	۲۰۸	۲۹۹/۵۹٦	۱/٤٤۰		



شکل ٤- دندروگرام حاصل شدت بیماری‌زایی قارچ *B.cinerea* بر روی رقم لوبیا درسا که بیش‌ترین شدت بیماری‌زایی در جدایه شماره BC-۱۹ که میزبان آن گیاه رز در منطقه پیشوا بوده است و تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین جدایه BC-19 با سایر جدایه‌ها را نشان می‌دهد.

بحث

از مهم‌ترین دلایل تنوع در جمعیت‌های قارچی می‌توان به فرایند-هایی هم‌چون هتروکاریوزیس، آنیوپلوئیدی، ترانسپوزون‌ها، جهش‌های خود به خودی، تولیدمثل جنسی و غیر جنسی اشاره نمود (Pontecorvo 1956). مطالعه روی میزان تنوع جمعیت در یک جامعه قارچی نقش مهمی در توسعه استراتژی‌های لازم برای تولید یک رقم با مقاومت پایدار خواهد داشت (Xia et al. 2000). سازگاری رویشی در تعداد زیادی از قارچ‌های ناقص دیده شده و گفته می‌شود تشکیل هتروکاریون در اثر تلاقی میسلیوم‌های جدایه‌های سازگار یکی از عوامل بروز تغییر در قارچ‌های ناقص است. جدایه‌هایی که سازگاری رویشی داشته و هتروکاریون تشکیل می‌دهند از نظر ژنتیکی بسیار به هم نزدیک هستند. این پدیده در مورد سایر قارچ‌ها نیز هم‌چون عامل بیماری بلاست برنج (*Magnaporthe oryzae*) دیده شده‌است. محققین از این خصوصیت قارچ‌ها استفاده کرده و روشی را به نام تعیین گروه-های سازگاری رویشی (Vegetative Compatibility Groups) VCG برای مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ‌های ناقص ابداع کرده‌اند. این تکنیک، توانایی توجیه نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های مولکولی را دارا بوده و حتی قادر است نژادها را از هم تفکیک نماید. از طرف دیگر به‌علت کم هزینه و قابل انجام بودن، می‌تواند در اغلب آزمایشگاه‌های بیمارشناسی گیاهی برای تعیین تنوع ژنتیکی قارچ مورد استفاده قرار گیرد. از آنجایی‌که واکنش‌های سازگاری یا ناسازگاری بین جدایه‌ها به‌صورت ظاهری قابل مشاهده نیست، می‌توان از جهش‌یافتگان مقاوم به سلنات (*sel*) جهت تشخیص گروه‌های سازگاری رویشی استفاده نمود. مطالعات بیانگر آن است که سلنات از طریق سیستم پرمئاز سلولی که سولفات را نیز به درون سلول هدایت می‌کند به داخل

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.5.7]

سلول قارچ‌هایی هم‌چون *Aspergillus* و *Penicillium* وارد می‌شود (Shrift 1961; Tweedie and Segel 1970). این سولفات پرمئازها تحت کنترل متابولیک سلولی بوده و با وضعیت گوگرد کنترل می‌شوند (Renosto et al. 1990). سلنات یک ترکیب سمی و آنالوگ سولفات بوده و برای اکثر سیستم‌های زنده به‌عنوان یک سرکوب کننده عمل می‌نماید. مقاومت نسبت به این ترکیب سمی در حالی صورت می‌گیرد که ژن‌های دخیل در مسیر بیوشیمیایی مصرف سولفات دچار جهش شوند. تاکنون جهش‌یافتگان متعددی شناخته شده‌اند که در ژن‌های مسیر بیوشیمیایی مصرف سولفات آن‌ها جهش رخ داده و متعاقباً به‌عنوان جهش‌یافتگان مقاوم به سلنات شناخته می‌شوند. از انواع این قارچ‌ها می‌توان به جنس‌هایی هم‌چون Neurospora (Marzluf 1970), Harp and (Correll and Leslie 1987), Magnaporthe (Correll 1998 (Arst 1968), Botrytis (Weeds et al. 1998), Fusarium Acremonium (Vialta et al. 1999), Aspergillus اشاره نمود. کرومات نیز یک ترکیب سمی دیگر و آنالوگ سولفات معدنی است. این ترکیب نیز به کمک سولفات پرمئازها به داخل سلول وارد شده و به‌نظر می‌رسد که قادر به تولید یک محصول پایدار وقتی که آنزیم ATP سولفوریلاز (اولین آنزیم مؤثر در مسیر بیوشیمیایی مصرف سولفات) روی آن عمل می‌کند می‌باشد. احتمالاً این ترکیب نیز برای سلول سمی است زیرا تجمع آن درون سلول‌ها احتمالاً از طریق اثرات قوی اکسید کنندگی‌اش منجر به مرگ سلولی می‌شود (Roberts and Marzluf 1971). در این تحقیق از تمامی جدایه‌های قارچ *B. Cinerea* جهش‌یافته‌های خود به خودی مقاوم به سلنات تولید شد. هم‌چنین فراوانی جهش‌یافته‌های *sel* بین جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق به‌طور قابل ملاحظه‌ای متفاوت بود. تقریباً همه جدایه‌هایی که به‌عنوان جهش‌یافته‌های *sel* تعیین شده بودند قادر به استفاده مؤثر از منابع سولفات نبوده و لذا به‌عنوان جهش یافته‌های ناتوان در جذب سولفات تعیین و تحت عنوان جهش‌یافته‌های *sul* شناسایی شدند. از بین ۳۰۰ قطاع سریع الرشد به‌دست آمده ۲۰۰ قطاع سریع الرشد جهش‌یافته *sel* بود که ٦٦ درصد آن جهش‌یافته *sul* در نظر گرفته شد. عواملی از قبیل شرایط محیطی مثل دما، تغذیه، فشار انتخاب و میزان مقاومت جدایه به مواد جهش‌زا راندمان تولید قطاع‌های سریع الرشد را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Leslie 1988). زمانی‌که جهش‌یافته‌های مربوط به هر جدایه در کنار هم قرار گرفتند عمدتاً با یکدیگر سازگار بودند و جدایه‌های ناسازگار به‌منظور جلوگیری از خطا در ادامه آزمایش حذف شدند (Korolev et al. 2008). خود سازگاری رویشی بین جهش‌یافته‌های قارچ *B.cinerea* نیز قبلاً در مورد جهش یافته‌های *nit* و مکمل سازی جهش یافته‌های *nit* با جهش‌یافته‌های *sul* گزارش شده‌است (Weeds et al. 1998). فنوتیپ جهش‌یافته‌های *sul* بر اساس نحوه رشد پر گنه‌ها بر روی محیط پتاسیم کرومات همراه سدیم سلنات تعیین شد. در این تحقیق ۷۰/۲۳ درصد از جدایه‌ها مربوط به کلاس فنوتیپ حساس و۲۹/۷٦ درصد باقی مانده دارای فنوتیپ مقاوم بودند. جهش‌یافتگان *sul* مربوط به جدایه‌های مختلف نیز در تمامی حالات ممکنه روی محیط حداقل (MM) با یکدیگر تلاقی داده شدند. در نهایت از مجموع ۲٦ جدایه مورد بررسی در این تحقیق ۱۵ گروه سازگاری رویشی تعیین شد. که هشت گروه تک عضوی و مابقی آن به‌صورت چند عضوی بودند. هم‌چنین VCG1 نسبت به سایر گروه‌های سازگاری رویشی بیش‌ترین درصد فراوانی جدایه‌ها را به خود اختصاص داد. از میان ۱۵ گروه سازگاری رویشی به‌دست آمده تنها در سه گروه سازگاری رویشی VCG3 و VCG7 و VCG11 جدایه‌ها مربوط به یک منطقه جغرافیایی بودند و در مورد سایر گروه‌ها یک ارتباط منطقی بین محل جمع‌آوری جدایه‌ها و گروه‌های سازگاری رویشی دیده نشد. به‌علاوه بین توان بیماری‌زایی جدایه‌ها و گروه‌های سازگاری رویشی نیز عدم رابطه معنی‌دار مشاهده شد، به این معنی که جدایه‌های قارچ *B. cinerea* در منطقه ورامین از تنوع بالایی برخوردار بوده و از نظر قدرت بیماری‌زایی بسیار متنوع هستند. Correll and Leslie (1987) در مطالعه روی جهش‌یافته‌های *sul* در قارچ‌های *Fusarium oxysporum* و *Fusarium solani* شباهت گزارش نمودند که با نتایج به‌دست آمده به‌وسیله Tyler et al. (1998) که به بررسی جهش‌یافته‌های *sul* در قارچ *Magnaporthe grisea* پرداختند متفاوت بود. این اختلاف احتمالاً به‌دلیل تفاوت در متابولیسم منابع سولفات در قارچ‌های آسکومیستی بروز نموده است (Tyler et al. 1998). اگرچه در مورد قارچ *M. grisea* نتایج Tyler et al. (1998) نشان داد که

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.5.7]

جهش‌یافته‌های *nit* که قادر به استفاده از منابع نیترات نبودند توانستند جهش‌یافته‌های *sul* را تکمیل کرده و برای بررسی گروه-های سازگاری رویشی مورد استفاده قرار گرفتند. در مورد قارچ *Aspergillus nidulans* نیز تا کنون پنج نوع جهش‌یافته *sul* شناخته شده‌است. گروه اول شامل جهش‌یافته‌های مقاوم به پتاسیم کرومات بوده و چهار گروه بعدی شامل چهار نوع مختلف از ژنوتیپ‌های حساس به کرومات می‌باشند. در تحقیقی که به‌وسیله Weeds et al. (1998) انجام شد نیز جهش‌یافته‌های مقاوم به سلنات که دارای انواع مقاوم و یا حساس به کرومات بودند در قارچ *B. cinerea* یافت شدند. Korolev et al. (2008) با بررسی گروه‌های سازگاری رویشی در بیست و یک جدایه از قارچ *B.cinerea* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف اسراییل ١٤ گروه سازگاری رویشی تعیین نمودند که ۱۲ گروه سازگاری رویشی آن تک عضوی و دو گروه باقی مانده چند عضوی بودند. (2002) Delecan and melgarejo تنوع در جمعیت قارچ *B.cinerea* را در میزبان‌های مختلف مورد مطالعه قرار داده و هفت گروه سازگاری رویشی را شناسایی نمودند اما هیچ ارتباطی بین قدرت بیماریزایی جدایه‌ها و گروه‌های سازگاری رویشی نیافتند. Beever and Stephanie (2003) تنوع در جمعیت قارچ *B.cinerea* را مورد مطالعه قرار داده و ۹ گروه سازگاری رویشی را شناسایی نمودند. در تحقیق دیگر ۲۲ جدایه قارچ *B. cinerea* در ۱۵ گروه سازگاری رویشی قرار گرفتند که در بین آن‌ها، ۱۲ گروه تک عضوی و سه گروه چند عضوی بودند (Glass et al. 2003). Weed et al. (1998) نیز گروه‌های سازگاری رویشی میان ۸۲ جدایه قارچ *B.cinerea* را مطالعه نموده و موفق به شناسایی ۵۹ گروه سازگاری رویشی شدند. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق به‌نظر می‌رسد که جمعیت قارچ *B.cinerea* در مناطق مورد بررسی در ایران از تنوع بالایی برخوردار باشد. هم‌چنین بین گروه‌های سازگاری رویشی با مناطق جغرافیایی در حداقل در سه گروه سازگاری رویشی رابطه مستقیم و با توان بیماری‌زایی نیز یک رابطه معکوس و معنی‌دار مشاهده شد. با توجه به مشابهت نتایج به‌دست آمده از این تحقیق با سایر مطالعات انجام شده روی قارچ *B. cinerea* به‌نظر می‌رسد که استفاده از جهش‌یافتگان *sul* راه مناسبی برای تعیین گروه‌های سازگاری رویشی دراین قارچ باشد. به‌علاوه بررسی ساختار جمعیت قارچ *Botrytis cinerea* در ایران در طی دوره‌های متناوب به‌منظور رصد دینامیک جمعیت و ارزیابی امکان ظهور نژادهای جدید بیماری‌زا به‌منظور کاهش اثرات ناشی از بیماری کپک پوسیدگی خاکستری پیشنهاد می‌شود.

منابع

Arst HN (1968) Genetic analysis of the first step of sulphate metabolism in (*Aspergillus nidulans*) Natur, 268-270.

Beever RE, and Parkes SL (2003) Use of nitrate non-utilizing (Nit) mutants to determine vegetative compatibility in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). European Journal of Plant Pathology, 109: 607-613.

Beever and Stephanie L, Parkes (2003) Use of nitrate non-utilising (Nit) mutants to determine vegetative compatibility in *Botryotinia fuckeliana (Botrytis cinerea*) European Journal of Plant Pathology, 109: 607-613, 2003.

Correll JC, Puhala JE, Schneider RW (1986) Identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. appi on the basis of colony size, virulence, and vegetative compatibility. Phytopathology, 76: 396-400.

Correl JC, Klittich C, J R, and Leslie JF (1987) Nitrate nonutilizing mutant of *Fusarium oxysporium* and their use invegatative compatibility test . phytoopathology,77:1640-1646.

Correll JC (1991) The relation ship between form a speciales, races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* . Phytopathology, 81: 1061-1064.

Delc´an J, Melgarejo P (2002) Mating behaviour and vegetative compatibility in Spanish populations of *Botrytotinia fuckeliana*. European Journal of Plant Pathology, 108: 391-400.

Edwards SG, Seddon B (2001) Selective media for the specific isolation of *Botrytis cinerea.* letters in Applied Microbiology, 32: 63-66.

Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (2004) Botrytis: Biology Pathology and Control. Kluwer Academic Publishers Dordrecht. The Netherlands 4 pp.

Glass N l, Kaneko l (2003) Fatal extraction non self recognition and hetrokaryon incompatibility in filamentous fungi .eukaryotic cell. 2:1-8.

Harp TL, Correl JC (1998) Recovery and characterization of spontaneous selenite-Resistanse mutation of *Magnaporthe grisa*, the rice blast pathogen. Mycologia, 90:954-963.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.5.7]

Jin C, Reed JC (2002) Yast and apoptosis.Nature Reviews Molecular Cell Biology, 3:453-459.
Khodaparast A (1392) Dynasty fungi. Second edition.Gilan University Press.303. (In Farsi).
Kistler HC, Bosland Pw, Benny U, Leony S, Williamson P H (1987) Relutedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifer measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. Phythopathology, 77: 1289-1293.
Korolev N, Katan T, Elad Y (2006) Use of selenate-resistant strains as markers for the spread and survival of *Botrytis cinerea* under greenhouse conditions. Phytopathology, 96: 1195-1203.
Korolev N, Elad Y, Katan T(2008) Vegatative compatibility grouping in Botrytis cinerea using sulphate non- utilizing mutant. European Journal of Plant Pathology, 122: 369-383.
Koonin EV, Aravind L (2002) Origin and evolution of eukaryotic apoptosis; the bacterial conncetion . Cell Death and Differentiation. 9:394-404.
Leslie AM (1988) some implicutions of pretense for mechanisms underlying the childs theory of mind.InJ.AstingtonP.Harris and D.Olson(Eds)Developing Tbeoris of mind:Cambridge University Press.
Leslie JF (1993) Vegetative compatibility in fungi. Annual Review of Phytopathology, 31: 127- 151.
Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual, Black well Publishing. 387 pp.
Marzluf GA (1970) Genetic and metabolic controls for sulfate metabolism in *Neurospora crassa*: IsoIation and study of chromate-resistant and sulfate transport-negative mutants. Journal of Bacteriology, 102:716-720.
Mirzaei HH, Meshkatalsadata MH, soheilvand S (2002) Deler mination of assentiall oil composition of prangosa acuilse (DC) Boranm obtained by hydrodistillation and supereritical fluide extaction met hods. Journal of Applied science, 7: 2535-2538.
Nielsen K (2000) Molecular characterization and biological control of grey mould (Botrytis spp.) in onion. Ph.D. thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark.
Pontecorvo G (1956) The parasexual cycle in fungi. Annual Review of Microbiology.10:393-400.
Puhalla JE (1984) A visual indicatore of heterokaryosis in (*Fusarium oxysporium* f.sp).apli from celery. Canadian Journal of Botany. 62:540-545.
Puhalla JE (1985) Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative Journal compatibility. Canadian Journal of Botany, 63: 179-183.
Puhalla JE, Spieth PT (1985) A comparision of heterokaryosis and vegetative incompatibility among varieties of *Gibberella fujikuroia*. Experimental Mycology 9: 39-47.
Renosto F, Martin RL, Wailes LM, Daley LA, Segel IH (1990) Journal of Biological Chemistry, 265: 10300±10308.
Roberts KR, Marzluf GA (1971) The specific interactain of chromate with the dual sulfate permease Systems of *Neurospora crassa.* Archives of Biochemical Biophysics,142: 641-659.
Shrift A (1961) Biochemical inter relaction between selenium and sulfur implant cro organism, Federation of American Societies for Experimental Biology, 20: 695-702.
Tweediej W, Segel IH (1970) Specificity of transport processes for sulfur, selenium and molybdenum anions by filamentous fungi. Biochimical et biophysica acta, 196: 95-106.
Tyler L, Harp and James C, Correl mycologyia (1998) Recovery and characterization of spantaneouse, selenite resistant mutant of *Magnarorthe grisa*, the Rice Blast pathogen 20: 954-963.
Vialta A, Catani C F, Junior RB, Azevedo JL (1999) Isolation and characterization of selenate resistant mutants of *Acremonium chrysogenum*. Brazil Archives of Biological Technology, 42: 369-374.
Vogel HJ (1964) Distribution of lysine pathways among fungi: Evolutionary implications. The American Naturalist, 98: 435-446.
weeds PL, Beever R L, Long PL (1998) New genetic markers for *Botrytis cinerea* (Botryotinia fuckeliana). Mycological Research, 102: 791-800.
Woo SL, Zoina A, Delsorbo G, Lorito M, Nanni B, Scala F, Novielo C (1996) Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. phaseoli by pathogenic races, VCG, RLFP, and RAPD. Phytopathology, 86: 966-973.
Xia JQ, Correll JC, Rhoads DD (2000) Regional population diversity of *Pyricularia grisea* in Arkansas & the influence of host selection. Plant Disease Journal, 84: 877-884.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.5.7]