گروه‌های سازگار رویشی در جمعیت‌های قارچ *Cryphonectria parasitica* عامل سوختگی شاه‌بلوط در استان گیلان*

VEGETATIVE COMPATIBILITY GROUPS IN POPULATIONS OF *Cryphonectria parasitica*, THE CAUSAL AGENT OF CHESTNUT BLIGHT IN GUILAN PROVINCE, IRAN

شقایق مهدی‌نژاد مقدم[۱]، سید اکبر خداپرست[۱**]، سالار جمالی[۱] و محمدجعفر فارسی[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۶/۳۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۲/۱)

چکیده

قارچ *Cryphonectria parasitica* عامل سوختگی شاه‌بلوط، از مهم‌ترین بیماری‌های درختان شاه‌بلوط (*Castanea sativa*) در استان گیلان می‌باشد. این مطالعه به منظور بررسی ساختار جمعیت این قارچ در چهار منطقه اصلی شفت (شامل ویسرود، طالقان و بابارکاب)، لاهیجان (شامل شاه‌بلوط محله و غریب آباد)، رضوانشهر (شامل دوران) و رشت انجام گرفت. تعیین گروه‌های سازگار رویشی براساس واکنش ناسازگاری و تشکیل ناحیه ممانعت از رشد، روی محیط PDA ارزیابی شد. براساس نتایج حاصل، چهار گروه سازگار رویشی ایرانی شامل IR-1 تا IR-4، از مجموع ۲۷۲ جدایه تحت بررسی، به دست آمد و در هر منطقه تنها یک تا دو گروه سازگار رویشی از میان جدایه‌های آن منطقه شناسایی شد. هم‌چنین نتایج این تحقیق نشان داد که گروه سازگار رویشی IR-1 با حضور در پنج جمعیت تحت مطالعه شامل ویسرود، طالقان، بابارکاب، دوران و رشت، فراوان‌ترین گروه را به میزان ۶۳/۲٪ کل جدایه‌ها، تشکیل داد و کمترین جمعیت در گروه‌های سازگار رویشی IR-4 با میزان ۳٪ به دست آمد که تنها در منطقه شاه‌بلوط محله شناسایی شد. گروه IR-2 در طالقان و بابارکاب به ترتیب با فراوانی ۵۰/۷٪ و ۳۱/۳٪ در میان جدایه‌های این مناطق فراوان‌ترین گروه بود. گروه IR-3 نیز در شاه‌بلوط محله با فراوانی ۸۸٪ و در دوران با فراوانی ۱۲٪ وجود داشت. شاخص تنوع شانون در بین جمعیت‌ها از صفر تا ۰/۵۸ (۰/۲ برای کل جمعیت‌ها) متغیر بود.

واژه‌های کلیدی: آناستوموز ریسه، کنترل بیولوژیک، ساختار جمعیت، تنوع ژنتیکی

---

*: بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Khodaparast@guilan.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲. استادیار پژوهش مؤسسه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان

مقدمه

عامل بیماری سوختگی شاه‌بلوط قارچ *Cryphonectria parasitica* (Murill) Barr می‌باشد که وقوع آن در ایران اولین بار در سال ۲۰۰۶ گزارش شد (Kazempour *et al.* 2006). این بیماری در سال‌های اخیر روی بسیاری از درختان شاه-بلوط (*Castanea sativa* Miller) استان گیلان گسترش یافته و خسارت زیادی را به وجود آورده است (Ghezi *et al.* 2010). طی بررسی‌های انجام شده در دنیا کنترل بیولوژیک بر اساس انتقال ویروس توسط جدایه‌های کم‌آزار (هیپوویرولانت) ممکن است سبب بهبودی درختان مبتلا به این بیماری گردد (Bissegger *et al.* 1997, Robin & Heiniger 2001,). این روش مبارزه از آنجا شکل گرفت که یک بهبود ناگهانی در وضعیت درختان آلوده در کشور ایتالیا در سال ۱۹۵۰ دیده شد. این پدیده یک نوع اثر طبیعی خودبخودی بود که توانست سبب کنترل بیماری در بسیاری از درختان آلوده شود (Anagnostakis 1986). کم‌آزاری در این قارچ وابسته به وجود ویروس‌های قارچی است (Hillman & Suzuki 2004, Linder Basso *et al.* 2005). بیشتر جدایه‌های کم آزار علاوه بر کاهش قدرت بیماری‌زایی خصوصیات فنوتیپی متفاوتی نسبت به جدایه‌های بیماری‌زا دارند به طوری که سرعت رشد، میزان تولید رنگدانه و اسپورزایی در آنان کمتر است (Locci 2003, Turina & Rostagno 2007). هیپوویروس‌ها در قارچ *C. parasitica* قادرند از طریق آناستوموز ریسه‌ای (انتقال افقی) از جدایه‌های کم‌آزار به جدایه‌های بیماری‌زا منتقل شوند و در طبیعت گسترش یابند (Cortesi *et al.* 2001, Ding *et al.* 2007).

عمل آناستوموز ریسه‌ای میان جدایه‌هایی اتفاق می‌افتد که دارای سازگاری رویشی باشند و جدایه‌هایی که قادر به تشکیل ریسه هتروکاریوتیک می‌باشند در یک گروه سازگار رویشی (VCG) از جمعیت قارچی خود قرار می‌گیرند. تشکیل آناستوموز میان جدایه‌هایی از گروه‌های متفاوت سازگار رویشی منجر به ایجاد عکس‌العمل ناسازگاری (Vic) می‌شود (Read & Roca 2006, Glass *et al.* 2000). این امر سبب می‌گردد تا انتقال خصوصیت کم‌آزاری میان سیستم سازگار رویشی محدود شود. مطالعات زیادی در زمینه شناسایی گروه‌های سازگار رویشی در مناطق انتشار این قارچ انجام شده است (مثل Cortesi *et al.* 1996, 1998; Robin & Heiniger 2001; Sotirovski *et al.* 2004; Montenegro *et al.* 2008; Liu & Milgroom 2007).

آناگنوستاکیس (Anagnostakis 1998) بیش از ۱۰۶ گروه سازگار رویشی را از جمعیت قارچ *C. parasitica* در آمریکا گزارش کرد.

در بسیاری از کشورهای اروپایی تنوع کمتری از گروهای VC مشاهده شده است. نتایج یک مطالعه در مقدونیه نشان می‌دهد که از میان ۷۸۶ جدایه ۹۴ درصد به یک گروه سازگار رویشی تعلق داشته‌اند (Sotirovski *et al.* 2004). هم‌چنین از میان ۳۷۹ جدایه آزمایش شده از یونان فقط یک گروه شناسایی شده است (Sotirovski *et al.* 2004). تنها نه گروه VC از شمال غربی اسپانیا گزارش گردیده است و هر جمعیت منطقه‌ای قارچ *C. parasitica* فقط وجود تعداد کمی از گروه‌ها را نشان داده است (Montenegro *et al.* 2008).

در ایتالیا ۳۱ گروه سازگار رویشی شناخته شده است (Cortesi *et al.* 1998, Trestic *et al.* 2001). طی چندین سال مطالعه در فرانسه ۳۰ گروه سازگار رویشی گزارش شده بود (Cortesi *et al.* 1996) اما در مطالعات سال‌های اخیر این تعداد افزایش یافته است (Robin *et al.* 2000). با توجه به اطلاعات در دسترس حداقل ۷۴ گروه

سازگار رویشی در اروپا شناخته شده است که با نام EU-1 تا EU-74 شناخته می‌شوند (Trestic *et al*. 2001, Robin *et al.* 2009) اما نتایج مطالعات اخیر نشان می‌دهد که این تعداد نیز در حال افزایش است (Robin *et al.* 2009).

در کشور مجارستان نیز تعداد کمی از گروه‌های سازگار رویشی شناسایی شده است. این امر سبب گشت به کارگیری جدایه‌های کم‌آزار به عنوان عامل بیوکنترل علیه بیماری سوختگی کاملاً موفق ارزیابی شود و درمان تعداد زیادی از درختان شاه‌بلوط تحت بررسی قرار گیرد (Vidoczi *et al.* 2007). به طوری‌که بیش از ۹۰٪ از درختان بیمار تحت درمان، در طی هشت سال بعد از عمل مایه‌زنی با جدایه‌های کم‌آزار توانستند سلامت خود را بازیابند.

بیشترین فراوانی گروه‌های سازگار رویشی در آسیا (چین و ژاپن)، جایی که قارچ *C. parasitica* بومی این قاره می‌باشد، وجود دارد. بر اساس مطالعات انجام شده در این دو کشور، در اغلب موارد هر جدایه به یک گروه سازگار رویشی تعلق داشته است (Liu & Milgroom 2007). به طوری که در ژاپن از میان ۷۹ جدایه، ۷۱ گروه سازگار رویشی شناسایی شده است و یا در چین از میان دو جمعیت (با ۱۱ و ۲۸ جدایه) هر کدام از جدایه‌ها به یک گروه مجزا تعلق داشته‌اند (Liu & Milgroom 2007).

میزان کم تنوع گروه‌های سازگار رویشی در بسیاری از کشورهای اروپایی توانسته است سبب موفقیت مبارزه بیولوژیک با استفاده ار جدایه‌های کم‌آزار گردد. در نتیجه سیستم ژنتیکی مسئول سازگاری رویشی مهم‌ترین مانع در کنترل بیولوژیک توسط جدایه‌های کم‌آزار علیه بیماری سوختگی شاه بلوط به شمار آورد (Anagnostakis 2001, MacDonald & Fullbright 1991, Gobbin *et al*. 2003, Cortesi *et al*. 1996). اگرچه برخی از مطالعات نشان داده است که تنها مانع کنترل بیولوژیک نمی‌باشد و عوامل دیگری نیز در این پدیده مؤثر هستند (Milgroom & Cortesi 2004).

در این پژوهش سازگاری رویشی میان جدایه‌های قارچ *C. parasitica* که از مناطق مختلف شاه‌بلوط کاری استان گیلان جداسازی شده‌اند به منظور تعیین تنوع گروه‌های سازگار رویشی، مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

مناطق نمونه برداری

سه منطقه شاه بلوط‌کاری در اطراف شهرستان‌های شفت، تالش و لاهیجان وجود دارد. منطقه شفت و تالش به صورت جنگل‌های طبیعی بوده و به ترتیب حدود ۵۰۰ و ۱۰۰ هکتار را شامل می‌شوند. منطقه لاهیجان در برگیرنده درختان کاشته شده است که اغلب به صورت پراکنده در دو روستا کاشته شده‌اند. علاوه بر این مناطق، تعدادی معدودی درخت شاه بلوط در باغ بذر سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان در رشت نیز کاشته شده است. برای این مطالعه سه مکان در شفت (شامل بابارکاب، طالقان و ویسرود)، دو مکان در لاهیجان (شامل شاه‌بلوط محله و غریب آباد)، یک مکان در تالش (دوران) و نیز درختان باغ بذر سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان برای مطالعه انتخاب شدند.

روش نمونه‌برداری

در این مطالعه از ۱۴۱ درخت نمونه‌برداری شد. بیشترین تعداد درخت نمونه‌برداری شده از دوران (۳۵ درخت) و کمترین آن از باغ بذر رشت (هفت درخت) بود. هم‌چنین از ویسرود ۲۹ درخت، طالقان ۲۵ درخت، بابارکاب ۱۵ درخت، شاه‌بلوط محله ۲۰ و غریب‌آباد ۱۰ درخت

نمونه‌برداری شد. با توجه به تعداد شانکرهای موجود روی درخت، از یک تا پنج شانکر روی هر درخت نمونه‌برداری شد. از هر شانکر پنج قطعه نمونه پوست درخت حاوی استرومای قارچ، چهار نمونه از حاشیه و یک نمونه نیز از وسط شانکر تهیه شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، تا زمان استفاده در یخچال نگه‌داری شدند.

جداسازی و تشخیص

برای جداسازی قارچ، قطعات کوچکی از نمونه‌ها که در برگیرنده استرومای قارچی بود، به اندازه حدوداً ۵×۵ میلی‌متری تهیه شد.

قطعات فوق به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۱۵٪ ، ضدعفونی و سپس با آب مقطر سترون شستشو شدند و به تشتک‌های پتری (نه سانتی‌متری) حاوی محیط کشت عصاره سیب زمینی + دکستروز + آگار (PDA) به میزان ۲۵ml در هر تشتک پتری، منتقل شدند و به مدت هفت روز در دمای ۲۵±۱°C تحت شرایط تاریکی نگه‌داری شدند. سپس تشتک‌های پتری فوق در روی میز آزمایشگاه زیر نور طبیعی به مدت یک هفته دیگر نگه‌داری شدند و از خصوصیات پرگنه آنها یاداشت‌برداری شد. پس از رشد قارچ و تایید گونه، از هر شانکر یک جدایه به طور تصادفی برای ادامه کار انتخاب شد. کلیه نمونه‌ها به روش تک‌اسپور روی محیط کشت آب-آگار ۲٪ به طریقی که قبلاً توسط *هو و کو* (Ho & Ko 1997) شرح داده شده است، خالص شدند. گونه *Cryphonectria parasitica* با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعات قبلی در استان گیلان (Ghezi *et al.* 2009, 2010) و نیز مقایسه مشخصات نمونه‌های به دست آمده با مشخصات این گونه در منابع (Hoegger *et al.* 2002, Myburg *et al.* 2004) تشخیص داده شد.

ارزیابی سازگاری رویشی

ابتدا جدایه‌های هر منطقه نمونه‌برداری شده جهت تعیین گروه‌های سازگار رویشی، به طور جداگانه ارزیابی شدند. طبق روش *جوهاسوا* و *همکاران* (Juhásová *et al.* 2005) یک جدایه به طور تصادفی به عنوان آزمایشگر انتخاب و سازگاری سایر جدایه‌های منطقه با آزمایشگر انتخابی بررسی شد. جدایه‌هایی که دارای سازگاری رویشی با آزمایشگر بودند در یک گروه سازگار رویشی قرار گرفتند و از بین جدایه‌های باقیمانده مجدداً یک جدایه به عنوان آزمایشگر (VCG جدید) انتخاب شد و سازگاری جدایه‌های باقیمانده توسط آن ارزیابی شد. این کار تا جایی ادامه پیدا کرد که تمامی جدایه‌ها تعیین گروه شدند و هر جدایه در یک گروه VC قرار گرفت.

برای تعیین سازگاری رویشی، ابتدا جدایه‌ها به محیط کشت مالت- آگار (MEA) ۲٪ به میزان ۲۰ میلی‌لیتر برای هر تشتک پتری (به قطر۹ سانتی‌متر) منتقل شدند. سپس طبق روش شرح داده شده توسط *پاول* (Powell 1995) و *آناگنوستاکیس* (۱۹۸۶) سایر مراحل کار انجام گرفت. بدین ترتیب که از حاشیه در حال رشد پرگنه قارچ *C. parasitica* با سن کمتر از هفت روز دیسک‌های میسلیومی مساوی از هر جدایه مورد نظر برداشته و با جدایه آزمایشگر به محیط کشت PDA غنی شده انتقال یافتند. محیط فوق شامل محیط PDA تازه (شامل عصاره ۲۰۰ گرم سیب زمینی + ۲۰ گرم دکستروز + ۲۰ گرم آگار برای یک لیتر) به همراه دو گرم عصاره مخمر، هفت گرم عصاره مالت، ۱۰۰ میلی‌گرم متیونین، دو میلی‌گرم بیوتین و پنج گرم آگار اضافی بود که به میزان ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت برای هر تشتک پتری در نظر گرفته شد. برای هر تشتک پتری، شش جدایه هر کدام به همراه جدایه آزمایشگر به فاصله حدود سه میلی‌متر از یکدیگر و

هم‌چنین به فاصله حدود یک سانتی‌متر از لبه تشتک پتری در مقابل هم قرار گرفتند (شکل ۱). هم‌چنین جفت‌هایی از یک جدایه به عنوان شاهد مثبت مقابل هم کشت گردیدند. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵±۱ °C به مدت پنج الی شش روز در تاریکی نگه‌داری شدند. جهت ارزیابی دقیق‌تر واکنش ناسازگاری، تشتک‌ها به مدت پنج روز نیز تحت روشنایی روزانه در شرایط آزمایشگاه گذاشته شدند. این کار به جهت افزایش تولید رنگدانه و پیکنیدیوم بیشتر در سطح محیط انجام شد که به تشخیص دقیق‌تر کمک کرد.

جهت اطمینان بیشتر از نتایج به دست آمده از بررسی سازگاری رویشی به روش فوق، برخی از جدایه‌ها به طور تصادفی انتخاب و با استفاده از سوسپانسیون به جای حلقه میسلیومی مجدداً ارزیابی شدند (Bissegger *et al.* 1997). در این روش مایه‌زنی کنیدیوم‌های هر جدایه به همراه آزمایشگر در مقابل هم صورت گرفت. همانند آزمایش قبل انتقال کنیدیوم‌ها بر روی محیط کشت به فاصله حدود سه میلی‌متری از یکدیگر و هم‌چنین به فاصله یک سانتی‌متر از لبه تشتک پتری انجام شد و محیط کشت مورد استفاده نیز همانند روش قبل (Powell 1995) تهیه گردید. برای تولید کنیدیوم فراوان، جدایه‌های رشد یافته روی محیط کشت مالت- آگار ۲٪ در دمای ۲۵±۱ °C تحت شرایط دوره روشنایی ۱۶ ساعت در روز نگه‌داری شدند. کنیدیوم‌ها توسط خلال دندان سترون برداشته و روی محیط کشت انتقال یافتند. سپس این تشتک‌ها تحت شرایط شرح داده شده در قبل نگه‌داری شدند (Bissegger *et al.* 1997).

ارزیابی سازگاری یا ناسازگاری رویشی بر اساس عدم وجود یا وجود ناحیه ممانعت از رشد در محل برخورد پرگنه دو جدایه ارزیابی شد. به طوری که وقتی دو جدایه سازگار با هم برخورد کردند میسلیوم آنها روی هم رشد کرده و در هم ادغام می‌شوند. در صورت عدم سازگاری مرز مشخص در محل برخورد دو جدایه به وجود آمده و میسلیوم دو جدایه در هم ادغام نمی‌شوند.

پس از تعیین گروه سازگار رویشی همه جدایه‌ها، جدایه نماینده هر گروه سازگار رویشی ایرانی با دو جدایه آزمایشگر قابل دسترس از ۷۴ گروه سازگاری رویشی اروپایی (Trestic *et al.* 2001, Robin *et al.* 2009) شامل گروه سازگاری اروپایی یک EU-1 (جدایه M1297) و دو EU-2 (جدایه M1115) قارچ *C. parasitica* (ارسال شده از کشور سوئیس توسط دکتر ریگلینک) به همین روش مقایسه گردیدند.

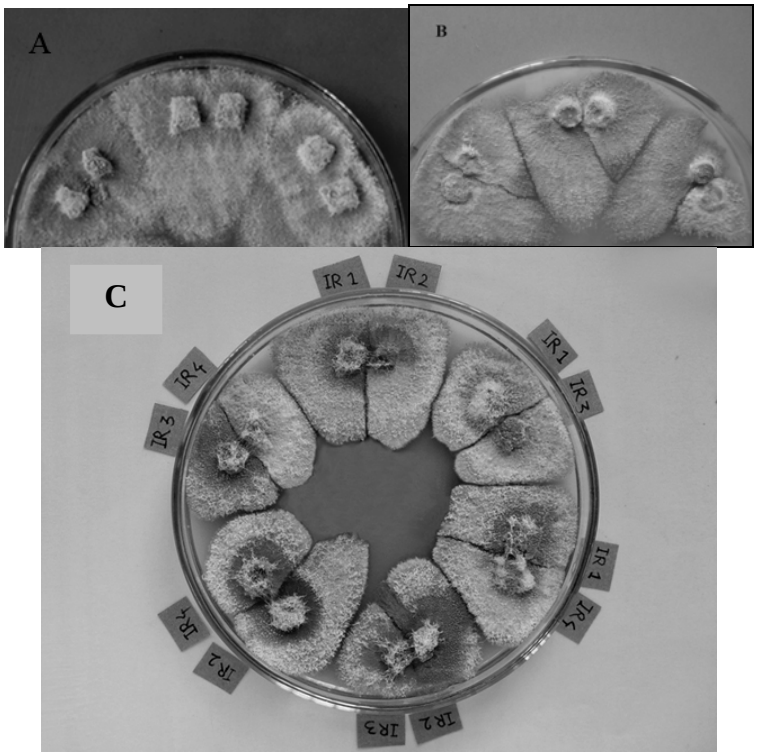
ارزیابی تنوع و فراوانی گروه‌های سازگار رویشی

در این بررسی تنوع گروه‌های VC بر اساس نسبت شمار گروه‌ها به تعداد کل جدایه‌ها در هر منطقه (*S/N*) و هم‌چنین شاخص تنوع شانون (H′) تعیین شد (Anagnostakis 1987). شاخص شانون طبق فرمول $Hvc = -\Sigma pi \times \ln pi$ محاسبه گردید که در آن pi فراوانی گروه سازگار رویشی i را نشان می‌دهد. فراوانی گروه‌های سازگار رویشی برای هر گروه نیز بر اساس نسبت جدایه‌های هر گروه به کل جدایه‌ها محاسبه شده است.

نتایج

جداسازی

در نهایت مجموع ۲۷۲ جدایه، شامل ۸۷ جدایه از دوران، ۶۰ جدایه از ویسرود، ۴۴ جدایه از طالقان، ۲۲ جدایه از بابارکاب، ۳۰ جدایه از شاه بلوط محله، ۱۲ جدایه از غریب آباد و ۱۷ جدایه از رشت به دست آمد (جدول ۱).



شکل ۱. سازگاری رویشی (A) و ناسازگاری رویشی (B) جدایه‌های قارچ *Cryphonectria parasitica* پس از گذشت پنج روز در دمای ۲۵±۱°C، (C) چهار گروه سازگار رویشی IR-1(VCG) تا IR-4 قارچ *Cryphonectria parasitica* در همه حالت‌های ممکن با هم جفت شده‌اند و عدم سازگاری رویشی بین آنها مشخص است.

Fig. 1. Vegetative compatibility (A) and incompatibility (B) among isolates of *Cryphonectria parasitica* after five days incubation at 25±1°C. (C) Four Vegetative compatibility groups of *C. parasitica* (VCG) IR-1 to IR-4 were paired in all combinations and show incompatibility.

تعیین گروه‌های سازگار رویشی

جدایه‌های مورد بررسی بعد از گذشت سه روز از کشت متقابل، با یکدیگر تلاقی یافتند. جدایه‌هایی که از لحاظ رویشی ناسازگار بودند ناحیه ممانعت ضعیفی را در محل الحاق تشکیل دادند که بعد از ۵ الی ۶ روز این منطقه با رشد بیشتر پرگنه جدایه‌ها به سمت مرکز تشتک، بیشتر قابل تشخیص بود (شکل ۱a,b). جدایه‌های سازگار پس از برخورد روی هم رشد کرده و پرگنه آنها در هم ادغام شدند. ارزیابی سازگاری رویشی میان جدایه‌های جفت شده توسط مایه‌زنی کنیدیوم‌ها روی محیط کشت نیز نتایج کاملاً مشابهی را با روش قبل نشان داد.

به این ترتیب گروه سازگار رویشی (VCG) هر یک از جدایه‌های *C. parasitica* به دست آمده از جمعیت‌های مختلف مناطق تحت بررسی تعیین شد. هر جدایه تنها به یک VCG تعلق داشت و هیچ جدایه‌ای با بیش از یک گروه VC سازگار نبود. در نهایت کلیه جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه در چهار گروه سازگار رویشی ایرانی قرار گرفتند که به صورت IR-1 تا IR-4 نام‌گذاری شدند. از طرف دیگر هیچ کدام از نمایندگان چهار گروه سازگار ایرانی با آزمایشگرهای اروپایی متعلق به گروه سازگار EU-1 و EU-2 سازگاری نداشتند.

جدول ۱. تعداد جدایه‌ها، پراکنش گروه‌های سازگار رویشی، فراوانی و تنوع شانون برای *Cryphonectria parasitica* در هر منطقه

Table 1. Number of isolates, distribution of vegetative compatibility groups, frequency and Shanon index in *Cryphonectria parasitica* in each region

vc type	Shaft			Total for region	Rezvanshahr	Lahijan		Total for region	Rasht	Total for all regions
	Visrood	Taleghan	Babarekab		Doran	Ghribribabad	Shahbalutmahaleh		Rasht	
IR1	60	10	1	71	84	0	0	0	17	172
IR2	0	34	21	55	0	12	0	12	0	67
IR3	0	0	0	0	3	0	22	22	0	25
IR4	0	0	0	0	0	0	8	8	0	8
N	60	44	22	126	87	12	30	42	17	272
S	1	2	2	2	2	1	2	3	1	4
S/N	0.02	0.04	0.09	0.01	0.02	0.08	0.07	0.07	0.06	0.01
H′	0	0.53	0.18	0.71	0.15	0	0.58	0.58	0	0.20

N =تعدادکل جدایه ها، =*S* تعداد گروه های سازگار رویشی (VC)، *H′* =شاخص تنوع شانون

N= number of total isolates, S= Number of VCG, *H′*= Shanon Index

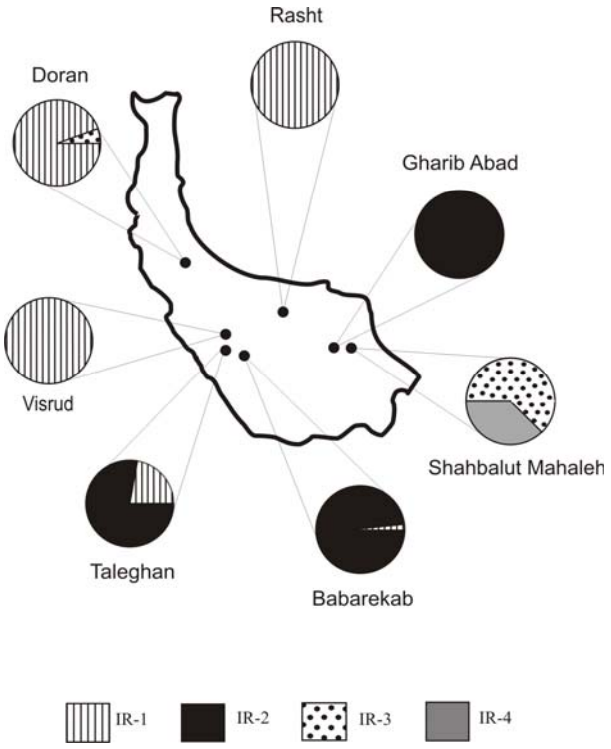
فراوانی گروه‌های سازگار رویشی

شکل ۲ پراکنش گروه‌های سازگار رویشی را و نسبت فراوانی آنها را در هر منطقه نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در این بررسی تنوع گروه‌های سازگار رویشی قارچ *C. parasitica* در هر منطقه تنها یک تا دو گروه در میان جدایه‌ها بود. در مناطق طالقان، بابارکاب، دوران و شاه‌بلوط محله هر کدام دارای دو گروه سازگار رویشی بودند. در هر کدام از مناطق غریب آباد، ویسرود و رشت نیز یک گروه سازگار رویشی تشخیص داده شد.

مطابق جدول شماره یک، گروه سازگار رویشی IR-1 که ۶۳/۲٪ از تمامی جدایه‌ها را در بر می‌گیرد، در پنج منطقه تحت مطالعه شامل ویسرود، طالقان، بابارکاب، دوران و رشت به دست آمد. این گروه VC در ویسرود و رشت تنها گروه سازگار رویشی را در بین جدایه‌های این مناطق تشکیل داد. در دوران بیشتر جدایه‌های ارزیابی شده از گروه IR-1 بودند. این تعداد، ۴۸/۸٪ جدایه‌های این گروه سازگار رویشی را شامل می‌شود. هم‌چنین گروه IR-1 تنها با یک جدایه در منطقه بابارکاب به دست آمد و کمترین میزان را در میان جمعیت این گروه با فراوانی ۰/۵۸٪ در بر گرفت. در این بررسی، ۵/۸٪ از جمعیت IR-1 نیز در طالقان حضور داشت.

در میان چهار گروه سازگار رویشی معرفی شده، گروه IR-4 کمترین تعداد جدایه *C. parasitica* را در خود جای داد که شامل۳٪ کل جدایه‌های هفت منطقه بود و تنها در منطقه شاه‌بلوط محله شناسایی شد.

گروه‌های سازگار رویشی IR-2 و IR-3 به ترتیب در سه و دو منطقه تحت بررسی حضور داشتند. گروه IR-2 در طالقان و بابارکاب به ترتیب با فراوانی ۵۰/۷٪ و ۳۱/۳٪ در میان جدایه‌های این مناطق غالب بود و در غریب آباد نیز به عنوان تنها گروه سازگار رویشی وجود داشت. فراوانی گروه IR-3 در شاه‌بلوط محله ۸۸٪ و در دوران ۱۲٪ کل جدایه‌های این گروه تعیین شد. نسبت تعداد VCG به شمار جدایه‌ها (*S/N*) از ۰/۰۲ در ویسرود و دوران تا ۰/۰۹ در بابارکاب متفاوت بود. میانگین این



شکل ۲. نسبت گروه‌های سازگار رویشی (VCG) جدایه‌های قارچ *Cryphonectria parasitica* در هر منطقه

Fig. 2. Portion of vegetative compatibility groups found among the isolates of *Cryphonectria parasitica* at each location

نسبت در کل مناطق ۰/۰۱ ارزیابی شد.

شاخص تنوع شانون (H') در میان جمعیت‌های تحت بررسی متغیر بود (جدول ۱). به طوری که از میزان صفر در مناطق ویسرود، غریب آباد و رشت تا ۰/۵۸ در شاه بلوط محله تفاوت داشت. این شاخص در طالقان ۰/۵۳، در بابارکاب ۰/۱۸ و در دوران ۰/۱۵ تعیین شد. میانگین H' در کل هفت منطقه ۰/۲ به دست آمد. برخلاف *S/N*، میزان تنوع H' با نسبت کل جدایه‌ها ارتباطی ندارد.

بحث

نتایج این بررسی نشان می‌دهد که تنوع گروه‌های سازگاری رویشی در مناطق تحت بررسی تنها با دارا بودن چهار گروه سازگار رویشی نسبتا کم است. به طوری که در هیچ کدام از این مناطق بیش از دو VCG مشاهده نشد و در سه منطقه نیز تنها یک VCG از جمعیت این قارچ تعیین شد. اگر چه گروه IR-1 در پنج منطقه مشاهده شد اما یک گروه سازگار رویشی خاص که در همه مناطق مورد بررسی وجود داشته باشد دیده نمی‌شود. پراکنش گروه‌های سازگاری رویشی در بین جمعیت‌های این قارچ نیز یکسان نبود. گروه IR-1 که بیشترین تعداد جدایه را در بر می‌گیرد در دو منطقه تمامی جمعیت این قارچ را شامل شد (H_{vc}=۰). در ایران شمار گروه‌های VC مشخصاً بسیار کمتر از سایر کشورهایی است که *C. parasitica* در درختان شاه‌بلوط آنان خسارت ایجاد کرده است. در آسیا جایی که *C. parasitica* بومی کشورهای چین و ژاپن می‌باشد، تنوع زیادی از گروه‌های سازگار رویشی این قارچ

وجـود دارد. در بررسـی کـه توسـط *وانـگ* و *همکـاران* (Wang *et al*. 1991) صـورت گرفـت، ۱۳۱ گـروه VC از میان ۲۱۹ جدایه در دو استان شرقی چین معرفی شد. وقوع این قارچ در ایران تقریباً ۷۰ سال پس از گزارش ورود این بیماری از آسـیای شـرقی (چـین و ژاپـن) بـه کـشورهای اروپای جنوبی اتفاق افتاده است. آنچه کـه انتظـار مـی‌رود این است که طولانی بودن حـضور *C. parasitica* در ایـن کشورها سبب افزایش گروه‌هـای VC بـه دلیـل نـوترکیبی جنسی، ورود گروه‌های VC جدید و یا موتاسیون‌هـا شـده است. ورود این قارچ به آمریکای شمالی که چنـدین دهـه زودتر از ورود آن به اروپا اتفاق افتاده اسـت، تنـوع بیـشتر گروه‌های VC را توجیه می‌کند. این تنوع بالا سبب گـشت تا در مبارزه بیولوژیک علیه بیماری، گسترش کـم‌آزاری در میان جدایه‌های بیماری‌زا در آمریکا به خوبی انجام نگیـرد. در برخـی از جمعیـت‌هـای *C. parasitica* در اروپـا نیـز همانند آنچه که در گیلان (ایران) مشاهده مـی‌شـود، تنـوع کمی از گروه‌هـای VC در میـان جمعیـت‌هـا وجـود دارد (Turina & Rostagno 2007, Cortesi *et al*. 1996). دستاورد این بررسی با گزارشات بررسی‌های انجام شده در تعیین ساختار ژنتیکی این قارچ در برخی کشورها از جمله پرتغال و اسلوواکی مشابه است (Adamcikova & Kobza 2006, Gouveia *et al.* 2001). *گوویـا* و *همکـاران* (Gouveia *et al.* 2001)، تنوع گروه‌های VC را با معرفـی چهار گروه VC در بین ۲۰۰ جدایه ایـن قـارچ در هـشت منطقه پرتغال نشان دادند. شمار گروه‌ها هماننـد نتـایج بـه دست آمده در ایران، در جمعیت هر منطقه تحـت بررسـی تنها یک تا دو گروه بود. رایج‌ترین گـروه در شـش منطقـه تعیین شد و در مجموع غالب جدایه‌ها را شـامل مـی‌شـد. هیچ گروهی نیز در تمامی مناطق حاضر نبود. *آدامـسیکوف* و *کوبزا* (Adamcikova & Kobza 2006) نیز بیـان کردنـد چهار گروه VC در بین ۲۱۵ جدایه این قارچ در اسلوواکی وجود دارد. اگرچه یک گروه VC در تمامی منـاطق تحـت بررسی به طور غالـب وجـود داشـت امـا میـزان تنـوع در جمعیت هر منطقه نیز یک تا دو گروه بود.

نسبت شمار گروه‌های VC به مجموع جدایه‌هـا (*S/N*) جهت توصیف تنوع گروه‌های سازگار رویـشی، وابـستگی زیادی به میزان کل جدایه‌ها (*N*) دارد کـه ایـن امـر سـبب ارائه ارزیابی دقیقی از میزان تنوع می‌گردد. اما از آنجایی که شاخص تنوع شانون وابستگی بسیار کمتری به میـزان کـل جدایه‌ها دارد، بنابراین ارزیـابی بـر مبنـای شـاخص تنـوع شانون نسبت به *S/N* ارجحیت دارد. در این بررسی میـزان شاخص تنوع در گیلان با کشور اسلوواکی که تنـوع کمـی در گروه‌های VC داشت، مشابه است. هم‌چنین در مقایـسه با مشاهداتی که از ارزیابی تنوع بـالای گـروه‌هـای VC در فرانـسه توسـط *روبـین* و *همکـاران* (Robin *et al*. 2000) گزارش شد، بیشترین میـزان شـاخص تنـوع در شـاه‌بلـوط محله (H_{vc} =۰/۵۸)، حتی در مقایسه با کمتـرین مقـدار در یکی از مناطق فرانـسه (H_{vc} = ۰/۶۶) نیـز رقـم کمتـری را نـشان داد. میـانگین شاخـص تنـوع شانـون در میـان جمعیت‌های این قارچ در فرانسه H_{vc}۱/۷۵ = تعیین شد که این مقدار بسیار بیشتر از میانگین ایـن شـاخص در گـیلان (۰/۲) بود. با توجه به این نتایـج امکـان اسـتفاده از نـژاد کم‌آزار برای مبارزه با این بیماری امیدوارکننـده اسـت. بـه ویژه اگر این موضوع را نیز در نظر داشته باشیم که در حال حاضر تنها روش مبارزه امیـد بخـش نیـز اسـتفاده از نـژاد کم‌آزار اسـت. *قـزی* و *همکـاران* (۲۰۰۹) در یـک مطالعـه نشان داده‌اند از بین ۱۲۰ جدایه دو جدایه بـا پرگنـه سـفید رنگ که احتمالاً معرف نژاد کم‌آزار حاوی هیپوویروس یک (CHV1) اروپایی بوده اسـت، در منطقـه بـه دسـت آمـده است. این ویروس از ویروس‌های بـسیار مـؤثر علیـه ایـن

بیماری به شمار می‌رود و بیشترین توجه را به خود جلب کرده است (Milgroom & Cortesi 2004). با این وجود با توجه به مطالعه *قزی* و *همکاران* (۲۰۰۹)، فراوانی این نژاد در طبیعت بسیار پایین بوده است (۲/۱۲۰). شاید به همین دلیل است که بیماری به سرعت در منطقه پیشرفت نموده است. اگرچه دستیابی دقیق به فراوانی نژاد کم‌آزار نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد، اما در صورت پایین بودن آن چاره‌ای جز تکثیر جدایه‌های کم‌آزار داخلی و وارد کردن مصنوعی آن به طبیعت نخواهد بود.

در این بررسی ارزیابی گروه‌های VC ایرانی با دو آزمایشگر بین‌المللی EU-1 و EU-2، قارچ *C. parasitica* وجود هیچ کدام از جدایه‌های تحت بررسی را در این دو گروه نشان نداد. بنابر مطالعات انجام شده در این زمینه، در بسیاری از کشورهای جنوبی و شرقی اروپا از میان تمامی گروه‌های اروپایی شناسایی شده گروه EU-12 رواج بیشتری دارد. *رادوکس* (Radocz 2001)، *روبین* و *هنیگر* (Robin & Heiniger 2001) و *آدامسیکوف و کوبزا* (۲۰۰۶) بیان کردند EU-12 یکی از عمده‌ترین گروه‌های VC موجود در کشورهای مقدونیه، یونان، بالکان، سیسیل، رومانی، بوسنی‌هرزگوین، اسلوواکی و مجارستان محسوب می‌شود و در کشورهای شرقی همچون رومانی و اکراین که به تازگی ورود قارچ *C. parasitica* در آنان گزارش شده است، حضور دارد. اما برطبق یافته‌های *روبین* و *هینیگر* (۲۰۰۱)، گروه EU-1 تنها در برخی از کشورهای اروپایی همچون مجارستان گزارش شده است و گروه EU-2 از گروه‌های رایج در مناطق شمال و شرق اروپاست.

تاکنون حدود ۷۴ گروه سازگار رویشی اروپایی گزارش شده است (Robin *et al.* 2009) و اگر تعداد آنها از سایر نقاط دنیا در نظر گرفته شود، خیلی بیش از این خواهد بود. از این رو جهت شناسایی ارتباط گروه‌های ایرانی با سایر گروهای سازگار رویشی در دنیا لازم است تعداد زیادی از این آزمایشگرها در دسترس بوده و مورد آزمایش قرار گیرند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (1-3) متن انگلیسی مراجعه شود.