تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی جمعیت‌های ایرانی قارچ عامل خشکیدگی شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.)

سیده معصومه زمانی[1*] و شیده موجرلو[2]

[1] **ایران، تهران، آموزش و ترویج کشاورزی، سازمان تحقیقات، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور**

[2] **ایران، شاهرود، دانشگاه صنعتی شاهرود، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی و باغبانی**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

شمشاد خزری از معدود درختان پهن‌برگ همیشه‌سبز جنگل‌های شمال البرز است که متأسفانه در فهرست گونه‌های در معرض خطر قراردارد. همچنین، اخیراً اغلب رویشگاه‌های شمشاد در شمال کشور به بیماری بلایت و خشکیدگی ناشی از قارچ *Cylindrocladium buxicola* مبتلا شده‌اند که خطر جدی برای بقا و تولید درختان شمشاد است. شناسایی ویژگی‌های جمعیت‌های این قارچ می‌تواند در گزینش استراتژی‌های مدیریت آن ارزشمند باشد. دراین تحقیق باهدف افزایش اطلاعات در خصوص جمعیت‌های ایرانی قارچ عامل بیماری، خصوصیات فنوتیپیِ جدایه‌های *C. buxicola* بدست آمده طی نمونه‌برداری تصادفی از رویشگاه‌های شمشاد شمال کشور، ارزیابی و تنوع ژنتیکی این جدایه‌ها براساس نشانگر ژنومی rep، بررسی شد. با ارزیابی ویژگی‌های مورفولوژیکی (شامل شکل و میزان رشد پرگنه، اندازه و شکل کنیدیوم، طول پایه، شکل و اندازه وزیکول انتهایی) در ۵۲ جدایه بدست آمده، تطابق ریخت‌شناسی تمام جدایه‌ها با گونه *Calonecteria pseudonaviculata* تأیید گردید. بررسی شدت بیماری‌زایی ۲۱ جدایه منتخب قارچی نشان داد این جدایه‌ها در گروه‌های بیماری‌زایی متفاوتی قرار دارند. آنالیز الگوهای باندی آغازگرهای ژنومی rep، نشان داد ۲۱ جدایه‌های منتخب بیش از ۹۵ درصد تشابه ژنتیکی داشته و در این سطح از تشابه به چهار گروه تقسیم شدند. جدایه‌های گروه‌های مختلف ژنتیکی در هر سه استان وجود داشتند. تمام جدایه‌های مورد مطالعه با قبول میزان تغییرات طبیعی درون‌گونه‌ای، متعلق به گونه اصلی *C. pseudonaviculta* بوده و خصوصیات اصلی و پایدار مورفو-فیزیولوژیک این‌گونه را داشتند. نظر به نرخ پایین تنوع میان جدایه‌ها، به نظر می‌رسد در کنترل این بیماری، استفاده از ارقام مقاوم مهمترین راهکار است.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌زایی، ریخت‌شناسی، ژنتیک جمعیت و *Cylindrocladium buxicola*.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۵-۴۴۷۸۷۲۸۲- ۰۲۱، پست الکترونیکی: mzamani@rifr-ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر با پیشرفت علوم طبیعی، اهمیت تنوع زیستی در زمینه‌های مختلف آشکار شده و اهداف مدیریت جنگل‌ها به سمت افزایش تنوع زیستی متمرکز شده است. به‌طوری که امروزه حفظ تنوع زیستی از مهمترین مسائل در مدیریت پایدار جنگل‌ها قلمداد می‌گردد (۲۱). اهمیت جنگل‌های ناحیه رویشی هیرکانی ازنظر حفظ ذخائر ژنتیکی و وجود برخی از گونه‌های گیاهی که منحصر به این منطقه می‌باشند، همچنین نقش حیاتی آن در ابعاد مختلف اقتصادی، اجتماعی، تعادل محیط‌زیست، حفاظت و تثبیت اکوسیستم‌ها، توجه مدیران را در سطح منطقه و ملی به خود جلب کرده است (۱۳). از مسائل مهم و حاد آن جنگل‌ها تخریب ناشی از عوامل انسانی و طبیعی می‌باشد

که در دهه اخیر، جنگل‌های ناحیه هیرکانی را با وضعیت بحرانی مواجه ساخته است.

شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark) از درختان همیشه سبز جنگل‌های هیرکانی است که در فهرست گونه-های گیاهی درخطر انقراض اتحادیه بین‌المللی حفظ طبیعت (IUCN) قرار دارد. این‌گونه بومی جنگل‌های ایران از حوالی دوره کرتاسه در دوران مزوزوئیک در جنوب دریای کاسپین تا ارتفاعی از نیم‌رخ شمالی رشته‌کوه البرز ظاهر شده است و سابقه پیدایش آن به حدود ۱۳۵ میلیون سال قبل می‌رسد (۱۳). این‌گونه به دلیل اهمیتی که دارد ممنوع‌القطع است، اما در سال‌های اخیر سطح قابل‌توجهی از جنگل‌های شمشاد دچار بیماری بلایت یا سوختگی شده است و این خشکیدگی در تمام مراحل زیستی این‌گونه از نهال تا درخت مسن به چشم می‌خورد. این در حالی است که به علت محدود بودن شمشادها چنانچه این‌گونه نابود شود، یکی از ذخایر گونه گیاهی باارزش ایران از بین خواهد رفت، از این‌رو چگونگی برون‌رفت از این مسئله دغدغه اصلی دست اندرکاران منابع طبیعی کشور می‌باشد. عامل این بیماری به گونه‌ای از قارچ *Calonectria* از خانواده آسکومیست‌ها نسبت داده شده است (*C. pseudonaviculatum*: syn. *Cylindrocladium pseudonaviculata, C. buxicola*) که تک میزبانه و دارای چرخه‌های بیماری کوتاه و سریعی (کمتر از یک هفته) بوده و وقوع آن سبب ایجاد حالت سوختگی در برگ شمشاد، توسعه آن موجب خزان درخت و استمرار آن در چند سال متوالی منجر به خشکیدگی درخت خواهد شد (۱۲).

این بیماری اولین بار در سال ۱۳۹۰ در شمشادستان‌های جنگل‌های آستارا مشاهده شد و از همان زمان به‌سرعت در سطح وسیعی از گستره پوشش درختان شمشاد در جنگل-های هیرکانی شیوع یافت (۱۷و ۱۸). بروز این بیماری و خطر انقراض گونه شمشاد ضرورت برنامه‌ریزی و تدوین راهبردهای مناسب برای مبارزه با این بیماری را ایجاب می‌کند، از طرفی مهمترین گام در مدیریت و کنترل یک بیماری گیاهی، داشتن اطلاعات کافی از دامنه تغییرات طبیعی در خصوصیات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و بیماری‌زایی جمعیت‌های بیمارگر مربوطه است، چراکه این مسئله ما را در تنظیم استراتژی‌های کنترل کارآمدتر، توانا می‌سازد. بطور مثال زمانی که یک اپیدمی رخ می‌دهد، دانستن پاسخ این سؤالات که آیا اپیدمی درنتیجه مساعد شدن شرایط محیطی برای بیماری پیش‌آمده، یا به دلیل ایجاد موتاسیون در ژنتیک بیمارگر و به وجود آمدن یک جدایه جدید از بیمارگر که ویرولانس بیشتری دارد، رخ‌داده است، می‌تواند در اعمال مدیریت مؤثر بیماری نقش مهمی داشته باشد (۱۵). بنابراین اگر استراتژی‌های کنترل بخواهند مؤثر واقع شوند می‌بایست به‌جای تمرکز روی حالت انفرادی و ویژه، جمعیت‌ها را هدف قرار دهند (۱۶). از این‌رو در کشورهای مختلف جهان تحقیقات گسترده‌ای به‌منظور شناسایی جمعیت‌های این قارچ انجام شده است (۳، ۴و ۱۹). درحالیکه در ایران اطلاع دقیقی در خصوص تنوع جمعیت‌های این قارچ در دست نیست و بالا بردن اطلاعات در این زمینه مسلماً در اتخاذ روش‌های مؤثر کنترل و میزان موفقیت پس از اعمال این روش‌ها نقش خواهد داشت. از سوی دیگر در بیماری‌شناسی گیاهی برای دستیابی به بهترین روش مدیریت یک بیماری، شناسایی فاکتورهایی که مهم‌ترین نقش را در تکامل بیمارگر دارند و اینکه چگونه این نیروهای تکاملی برهم اثر متقابل دارند تا ترکیب ژنتیکی و پتانسیل تکاملی جمعیت‌های بیمارگر را رقم بزنند بسیار حائز اهمیت است (۱۰)، بنابراین شناسایی ساختار فنوتیپی و ژنوتیپی جمعیت بیمارگرها اهمیت زیادی دارد. درمجموع، در یک‌گونه معین قارچی، جدایه‌ها ممکن است اختصاصی میزبان و (یا) زیستگاه باشند یا ممکن است با منشأ جغرافیایی شناخته شوند. لذا تعیین نقش میزبان یا محیط‌زیست در هدایت سازگاری ژنتیکی جمعیت‌ها، برای شناسایی جدایه‌های بیمارگر در هر منطقه و به دنبال آن کنترل این جدایه در

یک محیط‌زیست خاص، اهمیت به‌سزایی پیدا می‌کند (۱۶).

هدف این تحقیق شناسایی تنوع مورفولوژیکی، بیماری‌زایی و ژنتیکی جدایه‌های *C. pseudonaviculatum* در ایران بود، تا به استناد آن بتوان در جهت مدیریت بهتر بیماری اقدام نمود. مسلماً مطالعه ساختار جمعیتی قارچ‌های بیمارگر، نه‌تنها به اتخاذ استراتژی‌های مؤثر در کنترل می‌انجامد، بلکه در برنامه‌های تولید ارقام مقاوم و تعیین سیاست‌های قرنطینه‌ای مؤثر نیز نقش اساسی دارد.

مواد و روشها

۱- نمونه‌برداری: طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۶ ضمن بازدید از رویشگاه‌های شمشاد در استان‌های مازندران، گیلان و گلستان، نمونه‌های گیاهی (شامل سرشاخه‌ها، برگ‌ها و یا گیاهچه‌های در حال خشک شدن) مشکوک به آلودگی بلایت که دارای آثاری از قارچ و یا علائمی از این بیماری بودند (خشکیدگی، لکه برگی، بار قارچی و غیره)، بطور تصادفی از درختان شمشاد جمع‌آوری و پس از ثبت مشخصات گیاه بیمار، رویشگاه و تاریخ نمونه‌برداری، جهت جداسازی بیمارگر در شرایط خنک سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردیدند (شکل ۱).

شکل ۱- جمع‌آوری سرشاخه‌های دارای علائم آلودگی (خشکیدگی، لکه برگی، بار قارچی) *Cylindrocladium buxicola* از درختان شمشاد

۲- جداسازی بیمارگر: برای جداسازی بیمارگر از بافت-های گیاهی، ابتدا سرشاخه‌ها به قطعات حدوداً ده سانتی‌متری تقسیم و سپس به مدت یک ساعت تحت جریان آب معمولی پیش‌سترون‌سازی شدند. پس از این مرحله، سرشاخه‌ها به قطعات حدوداً ۳ تا ۴ سانتی‌متری که حاوی برگ‌های دارای علائم بودند برش داده شده و به اتاقک کشت استریل منتقل شدند. در اتاقک کشت نمونه‌ها در محلول سترون کننده هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی و از این قطعات نمونه‌هایی شامل برگ و قطعات ساقه از حدفاصل بافت آلوده و سالم جدا و در محیط سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) کشت گردید. ظروف پتری در دمای ۲۵ -۲۳ درجه سانتی‌گراد تا زمان ایجاد و رشد کلنی قارچی نگهداری شدند. سپس از نوک ریسه واقع در حاشیه رشد قارچ برداشته و به محیط PDA منتقل شد. روش دیگر جداسازی قارچ، قرار دادن برگ‌ها و ساقه‌های آلوده در دسیکاتور مرطوب در دمای ۲۵ -۲۳ درجه سانتی‌گراد به‌منظور القاء اسپورزایی قارچ بود. برای این منظور ابتدا نسوج آلوده برگ و سرشاخه‌ها تفکیک و پس از ضدعفونی با محلول هیپوکلریت سدیم (یک درصد) روی کاغذ صافی سترون درون ظروف پتری در داخل دسیکاتور قرارداده شدند. در مواردی که قارچ روی بافت تولید لایه اسپوری (متشکل از میسلیوم و اسپورهای قارچ) نموده بود، جداسازی قارچ با کشیدن یک لوپ به این لایه و انتقال آن به محیط PDA صورت گرفت (شکل ۲).

ایزوله‌های قارچی بدست آمده، با توجه به خصوصیات ماکروسکوپی (ریخت‌شناسی، الگوی رویشی و رنگ پرگنه) و میکروسکوپی (خصوصیات کنیدیوم‌ها) و مطابقت این ویژگی‌های ریخت‌شناسی با منابع موجود (۴، ۵و ۶) و نیز با عنایت به توصیف مجدد گونه توسط هنریکات و کالهام (۱۱) شناسایی شده و با روش تک اسپور نمودن روی محیط سیب‌زمینی- هویج- آگار خالص‌سازی شدند.

شکل ۲- خلاصه اقدامات انجام شده جهت جداسازی قارچ *Cylindrocladium buxicola* از درختان شمشاد

۳- بررسی خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک جدایه‌های قارچ *Cylindrocladium buxicola*

۳- ۱- بررسی سازگاری جنسی و اندام‌های زایشی جنسی: به‌منظور مشخص شدن هموتال بودن احتمالی جدایه‌ها، هریک از جدایه‌ها به‌تنهایی و در سه تکرار در پتری حاوی محیط سیب‌زمینی- دکستروز- آگار و نیز سیب‌زمینی- هویج- آگار کشت و بعد از دو هفته نگهداری در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، بطور هفتگی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۲۰X بررسی شدند. این نگهداری و مونیتورینگ تا ۳ ماه ادامه یافت. برای بررسی سازگاری جنسی و تولید احتمالی اندام زایشی جنسی پریتسیوم در این جدایه‌ها، از کشت متقابل آنها استفاده شد. بدین ترتیب که برای هر جدایه، برش‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت آن جدایه به همراه قطعه‌ای پنج میلی‌متری از هریک از دیگر جدایه در یک پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار یا سیب‌زمینی هویج آگار به فاصله سه سانتی‌متر از هم قرارداده و سپس در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از زمانی که حاشیه دو کلنی به یکدیگر رسید، احتمال وجود اندام‌های زایشی جنسی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۲۰X بررسی شد و این نگهداری و مونیتورینگ تا ۳ ماه ادامه یافت (۱۱).

۳- ۲- بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی اندام‌های زایشی غیرجنسی: به‌منظور بررسی ساختارهای غیرجنسی در هریک از جدایه‌های قارچی از سه پتری مجزای آن جدایه سوسپانسیون اسپور تهیه شد (۹) و مورد بررسی قرار گرفت. پس از تهیه اسلایدهای مناسب، برای هر جدایه شکل کنیدیوم، نحوه تشکیل آن، طول و پهنای کنیدی و اندازه و شکل پایه به‌طور تصادفی در ۳۰ عدد از این اندام‌ها برای هر جدایه، اندازه‌گیری و میانگین اندازه‌ها محاسبه گردید. برای مشاهده و ثبت الگو، رنگ و ظاهر پرگنه قارچی از محیط کشت عصاره مالت آگار (MEA) استفاده شد (۹و ۱۱).

۳- ۳- نرخ رشد خطی قارچ‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد: ابتدا از هریک از جدایه‌های قارچی محیط کشت هفت‌روزه بر پایه محیط PDA در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. برای تعیین نرخ رشد قارچ‌ها قرص آگار پنج میلی‌متری از حاشیه پرگنه در حال رشد جدایه‌ها به مرکز پتری دیش‌های محتوی محیط PDA (حدود ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت در ظروف پتری نه سانتیمتری) انتقال داده شد. سپس محیط کشت‌های تلقیح شده در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز نگهداری شدند. برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد. دو قطر عمود بر هم پرگنه هریک از قارچ‌ها در هر تکرار اندازه‌گیری و میانگین‌ها برای هر جدایه محاسبه شد. برای محاسبه نرخ رشد میسلیوم، اندازه قطر دیسک‌های اولیه که روی محیط-های کشت قرار داده شده بودند از اندازه قطر پرگنه کم شد.

۳-۴- بررسی توانایی رشد قارچ در دمای بالاتر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد: برای تعیین توانایی و نرخ رشد قارچ در دمای بالاتر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد، قرص آگار به قطر پنج

میلی‌متر از حاشیه پرگنه فعال قارچ (تهیه‌شده مطابق بند ۳- ۳) در محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (حدود ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت در ظروف پتری نه سانتیمتری) در سه تکرار کشت و پتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس رشد شعاعی پرگنه هر جدایه در این ۲۴ ساعت با کشیدن یک دایره در پشت پتری علامت‌گذاری و کشت‌ها به دمای ۲۶-۳۴ درجه سانتی‌گراد به فاصله ۲ درجه سانتی‌گراد در سه تکرار منتقل گردیدند. بعد از ده روز، رشد شعاعی پرگنه هر جدایه با کشیدن دایره دیگری در پشت پتری مشخص و دمای حداکثر برای رشد قارچ تعیین گردید.

۳- ۵- دمای غیرفعال شدن کنیدیوم جدایه‌ها: جهت تعیین دمای غیرفعال شدن کنیدیوم‌های قارچ در دمای بالاتر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد، قرص آگار به قطر پنج میلی-متر از حاشیه پرگنه فعال قارچ (تهیه شده مطابق بند ۳- ۳) در محیط سیب‌زمینی- هویج- آگار در سه تکرار کشت و پتری‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از ده روز، ظروف تحت نور آزمایشگاه به مدت دو تا سه روز قرارگرفتند. به این پتری‌ها آب مقطر استریل اضافه گردید و درون یخچالی تحت دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند، سپس پتری‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند تا کنیدی‌ها از کنیدی‌برها آزادسازی شوند. سپس سوسپانسیون‌های بدست آمده در غلظت 1×10^{4} اسپور در میلی‌لیتر تنظیم و به دمای ۲۶-۳۴ درجه سانتی‌گراد بافاصله ۲ درجه سانتی‌گراد در سه تکرار منتقل گردیدند. پس از ۲۴ ساعت ده قطره از این سوسپانسیون حاوی اسپور در سطح پتری حاوی آب- آگار دو درصد پخش شد. پتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. سپس پتری‌ها در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰X بررسی شد و وجود تک اسپورهای جوانه‌زده مورد ارزیابی قرارگرفت (۸).

۳- ۶- تعیین تنوع بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *Cylindrocladium buxicola*: پس از بررسی و اندازه‌گیری ابعاد ساختارهای رویشی و زایشی برای هر جدایه، متنوع‌ترین جدایه‌ها انتخاب و برای بررسی تنوع بیماری‌زایی و نیز تولید توده میسلیومی، استخراج DNA و سپس مطالعات مولکولی استفاده شدند.

برای ارزیابی ویژگی‌های بیماری‌زایی جدایه‌ها، روش شیشکوف و همکاران (۲۰۱۴) مورد استفاده قرارگرفت. جهت تهیه مایه تلقیح قارچ، از کشت هریک از جدایه‌ها در محیط آب آگار ۲ درصد به همراه برگ میخک و قرار دادن کشت‌ها در تناوب ۱۲ ساعت تاریکی/ روشنایی تحت نور نزدیک فرابنفش جهت اسپورزایی استفاده شد. پس از ۱۴ روز اسپورهای ایجاد شده با استفاده از آب مقطر استریل (به همراه ۰/۱ درصد توین ۲۰) از ظروف پتری جمع-آوری و در غلظت 2×10^{3} اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شدند. مایه‌زنی با روش فروبردن سرشاخه‌های بریده شده (دارای ۱۰ تا ۱۲ برگ) از نهال‌های شمشاد سالم در ارلن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور به مدت ۵ ثانیه انجام شد. سپس شاخه‌های تلقیح شده در فالکون‌های ۵۰ میلی-لیتری پر شده با آب قرار داده شدند. در هر فالکون سه‌شاخه و برای هر جدایه ۳ فالکون (به‌عنوان ۳ تکرار) تهیه شد که مجموعاً درون گلدانی قرار داده شده و به‌منظور ممانعت از تأثیر سایر جدایه‌های قارچی و نیز تأمین رطوبت بهینه جهت جوانه‌زنی اسپور، توسط پوشش نایلونی محصور گردید. در گلدان شاهد، سرشاخه‌ها به‌جای سوسپانسیون اسپور در آب مقطر استریل فروبرده شدند. نگهداری گلدان‌ها در ژرمیناتور با رطوبت ۹۰ درصد و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت نور (۵۰۰۰ -۳۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی صورت گرفت (شکل ۳).

شکل ۳- مایه‌زنی نهال‌های شمشاد با جدایه‌های *Cylindrocladium buxicola*

ارزیابی شدت بیماری روی سرشاخه‌ها، ۷ و ۱۱ روز پس از تلقیح مورد ارزیابی قرارگرفت. ۷ روز پس از تلقیح تعداد لکه‌ها در هر برگ شمارش شد. در روز ۱۱ پس از تلقیح تعداد برگ‌های آلوده و تعداد برگ‌های ریزش یافته مورد ارزیابی قرارگرفت. همچنین تعداد لکه‌های در هر ساقه نیز محاسبه گردید (۱۰).

۴- تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Cylindrocladium buxicola*: برای تکثیر میسلیوم جدایه‌ها، پس از خالص‌سازی آنها توسط روش تک اسپور از کشت در محیط مایع V8 استفاده شد. کشت‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس با استفاده از سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه، محیط مایع از میسلیوم خالص هر جدایه جداسازی و DNA کل قارچ توسط محلول CTAB (Cethyl Three methyl Amonium Bromide) استخراج شد (۹).

برای اطمینان از موفقیت استخراج DNA و بررسی کمیت و کیفیت DNA استحصالی پنج میکرولیتر از محلول DNA با یک میکرولیتر بافر رنگ ۶X (6X Loading buffer) مخلوط و از ژل آگارز یک و نیم درصد عبور داده شد. جهت تعیین غلظت DNA استخراج شده، از دستگاه بیوفتومتر استفاده گردید.

تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *C. buxicola* براساس انگشت‌نگاری DNA توسط نشانگر rep و با استفاده از آغازگرهای ERIC و REP صورت گرفت. توالی این آغازگرها به‌قرار زیر است:

ERIC2 Forward:
5′-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3′
ERIC1R Reverse:
5′-ATGTAAGCTCCTGGGGTTCAC-3′
REP2-I Forward:
5′-ICGICTTATCIGGCCTAC-3′
REP1R-I Reverse:
5′-IIICGICGICATCIGGC-3′

مقادیر حجمی مواد به‌کاررفته در یک واکنش PCR و نیز چرخه حرارتی برای واکنش PCR بر اساس روش کریمی و همکاران (2009) (۱۴) تنظیم گردید.

مشاهده محصول PCR توسط الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵٪ صورت گرفت. عمل PCR حداقل سه بار برای هر جدایه تکرار گردید و فقط قطعاتی از DNA که باند خوبی از آنها روی ژل دیده می‌شد، مورد ارزیابی قرارگرفتند.

به‌منظور رتبه‌بندی داده‌های حاصل از الکتروفورز و تجزیه خوشه‌ای آن‌ها (Cluster analysis)، ابتدا وزن باندها با استفاده از نرم‌افزار Photo-capt و براساس وزن باندهای نشانگر تعیین شد، از ماتریس داده‌ها که براساس باندهای مشترک روی ژل از صفر و یک تشکیل شده بود، برای ایجاد ماتریس شباهت بین جدایه‌ها براساس ضریب تشابه جاکارد (Jaccard’s coefficient) استفاده شد. براساس ماتریس شباهت، تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA در نرم‌افزار MVSP انجام و دندروگرام رسم گردید.

نتایج

۱- جداسازی بیمارگر: از مجموع ۳۱۰ نمونه گیاهی جمع‌آوری شده از رویشگاههای شمشاد در مناطق مختلف کشور مجموعاً ۵۲ جدایه از *C. buxicola* به دست آمد که اطلاعات این جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *Cylindrocladium buxicola* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران

شماره	کد جدایه	میزبان	منطقه جمع‌آوری	نمونه
۱	MCB-1	شمشاد خزری	مازندران، نوشهر	ریشه
۲	MCB-2	شمشاد خزری	مازندران، نوشهر	برگ
۳	MCB-3	شمشاد خزری	مازندران، نوشهر	ساقه
۴	MCB-4	شمشاد خزری	مازندران، نوشهر	ساقه
۵	MCB-5	شمشاد خزری	مازندران، نوشهر	برگ
۶	MCB-6	شمشاد خزری	مازندران، نوشهر	ساقه
۷	MCB-7	شمشاد خزری	مازندران، تنکابن	برگ
۸	MCB-8	شمشاد خزری	مازندران، تنکابن	برگ
۹	MCB-9	شمشاد خزری	مازندران، تنکابن	ساقه
۱۰	MCB-10	شمشاد خزری	مازندران، تنکابن	برگ
۱۱	MCB-11	شمشاد خزری	مازندران، چالوس	ساقه
۱۲	MCB-12	شمشاد خزری	مازندران، چالوس	ساقه
۱۳	MCB-13	شمشاد خزری	مازندران، نور	برگ
۱۴	MCB-14	شمشاد خزری	مازندران، نور	برگ
۱۵	MCB-15	شمشاد خزری	مازندران، نور	برگ
۱۶	MCB-16	شمشاد خزری	مازندران، نکا	ریشه
۱۷	MCB-17	شمشاد خزری	مازندران، نکا	برگ
۱۸	MCB-18	شمشاد خزری	مازندران، نکا	برگ
۱۹	MCB-29	شمشاد خزری	مازندران، نکا	برگ
۲۰	MCB-20	شمشاد خزری	مازندران، عباس‌آباد	ساقه
۲۱	MCB-21	شمشاد خزری	مازندران، عباس‌آباد	برگ
۲۲	MCB-22	شمشاد خزری	مازندران، عباس‌آباد	برگ
۲۴	MCB-22	شمشاد خزری	مازندران، عباس‌آباد	برگ
۲۵	GICB-1	شمشاد خزری	گیلان، ذخیره‌گاه جنگلی دکتر درستکار	برگ
۲۶	GICB-2	شمشاد خزری	گیلان، ذخیره‌گاه جنگلی دکتر درستکار	برگ
۲۷	GICB-3	شمشاد خزری	گیلان، ذخیره‌گاه جنگلی دکتر درستکار	ساقه
۲۸	GICB-4	شمشاد خزری	گیلان، ذخیره‌گاه جنگلی دکتر درستکار	برگ
۲۹	GICB-5	شمشاد خزری	گیلان، شفا رود	برگ
۳۰	GICB-6	شمشاد خزری	گیلان، شفا رود	ریشه
۳۱	GICB-7	شمشاد خزری	گیلان، شفا رود	ساقه
۳۲	GICB-8	شمشاد خزری	گیلان، شفا رود	برگ

ادامه جدول ۱

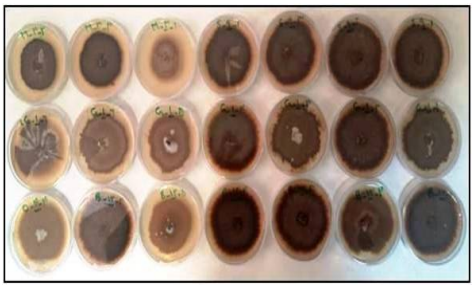
شماره	کد جدایه	میزبان	منطقه جمع‌آوری	نمونه

۳۳	GICB-9	شمشاد خزری	گیلان، شفا رود	برگ
۳۴	GICB-10	شمشاد خزری	گیلان، شفا رود	برگ
۳۵	GICB-11	شمشاد خزری	گیلان، شفا رود	برگ
۳۶	GICB-12	شمشاد خزری	گیلان، شفا رود	ساقه
۳۷	GICB-13	شمشاد خزری	گیلان، سیاهکل	برگ
۳۹	GICB-14	شمشاد خزری	گیلان، سیاهکل	ساقه
۴۰	GICB-15	شمشاد خزری	گیلان، سیاهکل	ریشه
۴۱	GICB-16	شمشاد خزری	گیلان، سیاهکل	برگ
۴۲	GICB-17	شمشاد خزری	گیلان، رودسر	برگ
۴۳	GICB-18	شمشاد خزری	گیلان، رودسر	برگ
۴۴	GOCB-1	شمشاد خزری	گلستان، چشمه بلبل	برگ
۴۵	GOCB-2	شمشاد خزری	گلستان، چشمه بلبل	برگ
۴۶	GOCB-3	شمشاد خزری	گلستان، چشمه بلبل	ساقه
۴۷	GOCB-4	شمشاد خزری	گلستان، چشمه بلبل	برگ
۴۸	GOCB-5	شمشاد خزری	گلستان، بندر گز	برگ
۴۹	GOCB-6	شمشاد خزری	گلستان، بندر گز	برگ
۵۰	GOCB-7	شمشاد خزری	گلستان، بندر گز	برگ
۵۱	GOCB-8	شمشاد خزری	گلستان، بندر گز	ساقه
۵۲	GOCB-9	شمشاد خزری	گلستان، بندر گز	ساقه

۲- بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیک جدایه‌های قارچ *Cylindrocladium buxicola*

۲- ۱- بررسی سازگاری جنسی و اندام‌های زایشی جنسی: پس از کشت متقابل ۵۲ جدایه قارچ *C. buxicola* و بررسی سازگاری جنسی و تولید احتمالی اندام زایشی جنسی پریتسیوم در آنها، مشخص شد در هیچ‌یک از جدایه‌ها پریتسیوم تشکیل نگردید. براساس این نتایج مشخص شد تمام جدایه‌های این قارچ هتروتال بوده و همگی به یک نوع تیپ آمیزشی تعلق دارند.

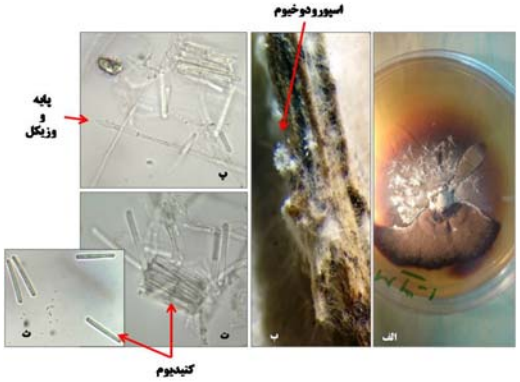
۲- ۲- بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی اندام‌های زایشی غیرجنسی: رنگ پرگنه جدایه‌ها روی محیط MEA در هفته اول رشد اغلب در مرکز متمایل به قهوه‌ای بوده و در اطراف توسط ریسه‌های سفید تا کرم‌رنگ احاطه شده بود، اما به‌تدریج با افزایش سن کشت‌ها تفاوتی‌هایی در رنگ و الگوی رشد پرگنه در میان جدایه‌ها ایجاد شد. بطوریکه برخی جدایه‌ها پرگنه منظم و برخی پرگنه نامنظمی داشتند، رنگ پرگنه نیز میان جدایه‌ها متفاوت بود و در طیفی از قهوه‌ای تیره تا قهوه‌ای روشن و حتی کرم‌رنگ قرار داشت (شکل ۴).



شکل ۴- پرگنه تعدادی از جدایه‌های *Cylindrocladium buxicola* در محیط عصاره مالت آگار (MEA)

جدایه‌های ایرانی قارچ *C. buxicola* در محیط کشت جامد قادر به تولید مقدار فراوانی کنیدی غیرجنسی بودند که ویژگی‌های ریخت‌شناسی کنیدی‌ها، کنیدی‌برها و پایه تفاوت چندانی میان جدایه ها نداشت. جدایه‌های بدست

آمده از این قارچ دارای کنیدیوم‌های شفاف و بی‌رنگ، راست، استوانه‌ای شکل، در دو انتها گرد و دارای یک دیواره عرضی بودند. میانگین ابعاد کنیدیوم ۵۱–۶۹× ۳/۵–۵/۵ میکرومتر بود. پایه که رشته‌ای عقیم و فاقد اندام زایشی است، طویل با میانگین طول ۱۵۱–۱۰۱ میکرومتر بود و در انتهای آن وزیکول بیضی‌شکل با میانگین عرض ۸/۹–۶/۴ میکرومتر تشکیل گردید (شکل ۵).



شکل ۵- اسپورهای *Cylindrocladium buxicola*؛ الف: تشکیل اسپور در محیط کشت جامد، ب: تشکیل اسپورودوخیوم روی ساقه شمشاد آلوده به بلایت در دسیکاتور مرطوب، پ: پایه و وزیکل، ت: کنیدیوم و کنیدی‌بر، ث: کنیدیوم

۲- ۳- نرخ رشد خطی قارچ‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد: همانند آنچه در مورد الگو و رنگ پرگنه در جدایه‌های ایرانی *C. buxicola* مشاهده شد، سرعت رشد پرگنه‌های قارچی نیز در میان جدایه‌ها متفاوت بود. اما درمجموع نرخ رشد پرگنه در تمام جدایه‌ها سرعت پایینی داشت، بطوریکه بعد از ۷ روز رشد روی محیط PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد میانگین قطر پرگنه از حداقل ۱/۱ سانتی‌متر تا حداکثر ۲ سانتی‌متر متغیر بود.

۲- ۴- بررسی توانایی رشد قارچ در دمای بالاتر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد: براساس این آزمون مشخص شد که مطابق آنچه سایر محققین در مورد دیگر جدایه‌های قارچ *C. buxicola* مشاهده نموده‌اند در مورد جدایه‌های ایرانی این قارچ نیز دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دمای بهینه رشد می‌باشد، چراکه با افزایش دما میزان رشد پرگنه قارچی کاهش یافت. در نهایت هیچ‌یک از جدایه‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و بالاتر قادر به رشد نبودند.

۲- ۵- دمای غیرفعال شدن کنیدیوم جدایه‌ها: دمای غیرفعال شدن کنیدیوم جدایه‌ها ۳۰–۲۸ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید و با افزایش دما نرخ اسپورزایی و نیز جوانه‌زنی اسپورها به‌سرعت کاهش یافت، بطوریکه در تعداد زیادی از جدایه‌ها در دمای ۲۸ سانتی‌گراد و در تعداد کمتری از آنها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اسپور جوانه‌زده‌ای مشاهده نشد.

۲- ۶- تعیین تنوع بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *Cylindrocladium buxicola*: برای انجام این آزمون ۲۱ جدایه که بیشترین تنوع را در ویژگی‌های ریخت‌شناسی داشتند انتخاب و به کار گرفته شدند. پس از انجام آزمون‌های مربوط به تنوع بیماری‌زایی مشخص گردید که تمامی جدایه‌ها قادرند دامنه‌ای از علائم مربوط به بیماری بلایت شمشاد شامل لکه برگی، لکه‌های سیگاری شکل بر روی ساقه و همچنین ریزش برگ‌ها را نشان دهند (شکل ۶).

شکل ۶- برخی علائم آلودگی در سرشاخه‌های شمشاد در نتیجه مایه‌زنی با اسپورهای *Cylindrocladium buxicola*

جدایه ها ازنظر شدت بیماری‌زایی روی سرشاخه‌های بریده شده شمشاد دارای اختلاف بودند، به نحوی که تعداد

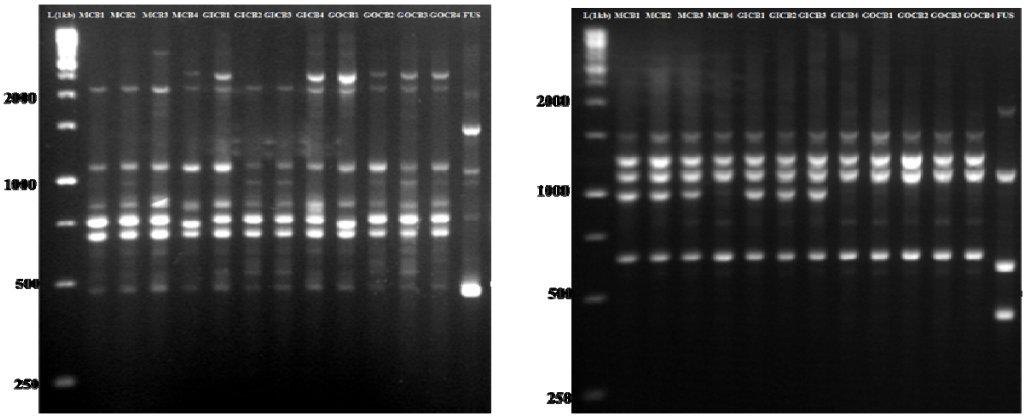
لکه‌ها، تعداد برگ‌های آلوده و تعداد برگ‌های ریزش یافته در میان جدایه‌ها متفاوت بود و بر این اساس جدایه‌ها در سطوح مختلفی قرارداشتند، اما ارتباطی میان مناطق جمع‌آوری جدایه‌ها و شدت بیماری‌زایی جدایه‌های آن منطقه وجود نداشت (جدول ۲).

جدول ۲- مشخصات بیماری‌زایی جدایه‌های منتخب *Cylindrocladium buxicola*

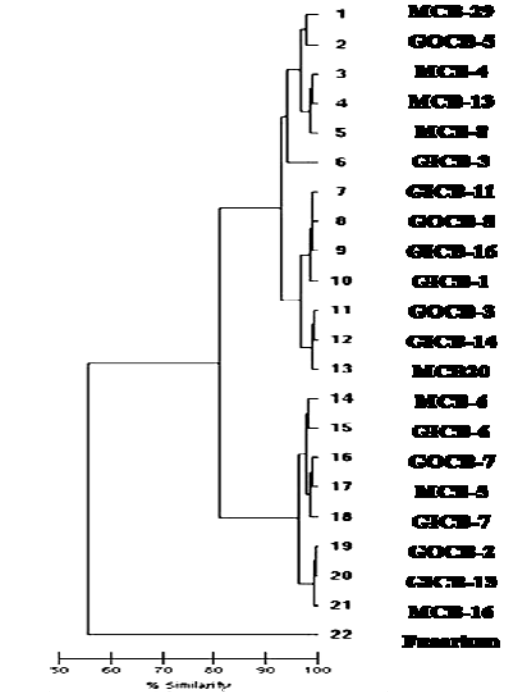
شماره	کد جدایه	میانگین درصد برگ‌های آلوده	میانگین تعداد لکه‌های برگی	میانگین تعداد لکه‌های ساقه	میانگین تعداد برگ‌های ریزش یافته
۱	MCB-4	۷۲/۵	۲/۸۵	۳/۲۲	۸/۳
۲	MCB-5	۷۰/۴	۴/۸۸	۱/۷۵	۹/۷
۳	MCB-6	۶۸/۵	۳/۳۴	۲/۸۱	۵/۶
۴	MCB-8	۶۲/۱	۵/۱۳	۱/۴۲	۷/۵
۵	MCB-13	۵۱/۲	۲/۱۳	۱/۰۵	۶/۵
۶	MCB-16	۴۸/۵	۳/۷۵	۲/۶۵	۱۱/۳
۷	MCB-20	۶۳/۵	۲/۳۸	۱/۸۱	۵/۳
۸	MCB-29	۵۹/۵	۵/۵	۲/۴۸	۱۴/۲
۹	GICB-1	۳۶/۲	۲/۲۹	۰/۷۵	۸/۵
۱۰	GICB-3	۵۹/۲	۵/۵	۴/۴	۱۰/۱
۱۱	GICB-6	۴۸/۴	۸/۱۶	۲/۸۸	۳/۱
۱۲	GICB-7	۷۴/۲	۱/۹۹	۱/۵	۳/۵
۱۳	GICB-11	۷۱/۵	۳/۸۵	۲/۲۲	۳/۱۴
۱۴	GICB-13	۳۸/۵	۲/۳۸	۱/۷۵	۰/۹
۱۵	GICB-14	۸۰/۹	۱۰/۵۱	۲/۷۹	۹/۲
۱۶	GICB-16	۶۴/۴	۷/۲۵	۲/۹۳	۳/۶
۱۷	GOCB-2	۵۹/۵	۳/۳۸	۲/۸۱	۷/۵
۱۸	GOCB-3	۶۷/۵	۱/۷۵	۱/۸۶	۶/۲
۱۹	GOCB-5	۴۱/۵	۱/۵۵	۰/۶	۴/۱
۲۰	GOCB-7	۵۰/۴	۳/۱۳	۱/۰۶	۶/۸
۲۱	GOCB-8	۳۶/۶	۳/۶۱	۱/۱۱	۰/۵

۳- تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Cylindrocladium buxicola*: در این آزمون ۲۱ جدایه که بیشترین تنوع را در ویژگی‌های مورفولوژیک داشتند انتخاب و به همراه یک جدایه فوزاریوم به‌عنوان Outgrop (۱۱) برای مطالعات مولکولی به کار گرفته شدند. پس از استخراج DNA و تکثیر آن توسط آغازگرهای rep، مشخص شد آغازگرهای انتخاب‌شده، به‌تنهایی قادر به تفکیک جدایه‌ها از یکدیگر به‌صورت ژنوتیپ‌های متفاوت نیستند و هریک از آنها به‌تنهایی تشابه بسیار بالایی را میان جدایه‌ها به نمایش گذاشتند (شکل ۷). از این‌رو مجموع داده‌های این آغازگرها باهم رتبه‌بندی شد تا بتوانند تنوع ژنتیکی جمعیت را نشان دهند.

بااستفاده از مجموع این دو آغازگر مجموعاً ۳۵ باند بدست آمد که توانست چندشکلی DNA این ۲۱ جدایه را در سطح ۹۵ درصد تشابه نشان دهد. دندروگرام حاصل از این ۳۵ باند که براساس ضریب جاکارد به دست آمد، در سطح تشابه ۹۵ درصد جدایه‌ها را به چهار گروه تقسیم نمود (شکل ۸). در هر گروه تنوعی از جدایه‌ها از استان مازندران، گیلان و گلستان جای گرفته و شباهت‌های ۹۵ تا ۹۹ درصد را نشان دادند (شکل ۸).



شکل ۷- یک نمونه از الگوهای باندی محصولات PCR جدایه‌های منتخب *Cylindrocladium buxicola* توسط آغازگر REP (بالا) و ERIC (پایین). اعداد در حاشیه شکل بیان‌کننده اندازه (جفت باز=bp) قطعات DNA تکثیرشده براساس نشانگر ژنومی ۱۰۰۰ جفت بازی هستند. حروف کوچک در بالای شکل، مشخصات جدایه‌ها می‌باشند



شکل ۸- دندروگرام ترسیم‌شده براساس روش UPGMA برای ۲۱ جدایه منتخب *Cylindrocladium buxicola*؛ با استفاده از مجموع آغازگرهای REP و ERIC. حروف کوچک در حاشیه شکل بیان‌کننده مشخصات جدایه‌ها می‌باشند

بحث و نتیجه‌گیری

توده‌های شمشاد یکی از کم‌نظیرترین توده‌های جنگلی در ناحیه اروپا-سیبری است که در گذشته به‌صورت نوار تقریباً پیوسته از آستارا تا شرق کردکوی به‌صورت زیراشکوب درختان بلوط، ممرز، افرا، نمدار و راش به‌خصوص در جنگل‌های جلگه- کوهپایه‌ای گسترده بودند، اما امروزه به‌صورت قطعات پراکنده‌ای مشاهده می‌شود (۱) که از دلایل آن بیماری بلایت و خشکیدگی ناشی از قارچ *Cylindrocladium buxicola* می‌باشد که خطر جدی برای بقا و تولید درختان شمشاد و اخیراً اغلب رویشگاه‌های شمشاد در شمال کشور به این قارچ مبتلا شده‌اند. پژوهش‌ها نشان می‌دهد حفاظت به‌عنوان یک فاکتور مهم نقش تعیین کننده در غنا و تنوع زیستی پوشش گیاهی دارد (۲). از سوی دیگر مهمترین گام در مدیریت یک بیماری گیاهی، داشتن اطلاعات کافی از دامنه تغییرات طبیعی در خصوصیات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و بیماری‌زایی جمعیت‌های بیمارگر مربوطه است و درواقع

شناسایی ویژگی‌های جمعیت‌های قارچ می‌تواند در گزینش استراتژی‌های مدیریت آن ارزشمند باشد.

دراین تحقیق پس از جمع‌آوری مجموعاً ۳۱۰ نمونه گیاهی شمشاد از مناطق مختلف کشور مجموعاً ۵۲ جدایه از قارچ *C. buxicola*، پس از شناسایی آنها با عنایت به کلیدهای تشخیص گونه (۵، ۶و ۷) و نیز توصیف مجدد گونه توسط هنریکات و کالهام (۹) به دست آمد.

بررسی سازگاری جنسی و تولید اندام‌های زایشی جنسی این جدایه‌ها نشان داد هیچ‌یک از جدایه‌ها در شرایط ذکرشده قادر به تولید پریتسیوم نبوده‌اند، براساس این آزمون مشخص گردید که تمام جدایه‌های ایرانی بدست آمده از این قارچ هتروتال و متعلق به یک نوع تیپ آمیزشی می‌باشند. این نتیجه با گزارشات دیگر محققین روی جدایه‌های دیگری از این قارچ مطابقت داشت (۹و ۱۱). در توصیف مجدد این‌گونه که اخیراً صورت گرفته (۹) نیز ذکرشده که تاکنون پریتسیوم، تنها در معدودی از جدایه‌ها گزارش شده است.

دراین تحقیق، بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی پرگنه جدایه‌های ایرانی قارچ *C. buxicola*، نشان داد محیط MEA برای مطالعه و مشخص نمودن تفاوت میان جدایه‌ها ازنظر رنگ و شکل پرگنه بسیار مناسب است و در این محیط با افزایش سن کشت، در رنگ و الگوی رشد پرگنه در میان جدایه‌ها تفاوت‌هایی وجود دارد. این یافته مطابق با گزارش هنریکات و کالهام (۱۱) می‌باشد.

به‌کارگیری روش گسکیر و همکاران (۹) برای تولید کنیدی‌های غیرجنسی قارچ موجب تشکیل مقدار فراوانی اسپور در هریک از جدایه‌ها در محیط کشت جامد شد (شکل ۵، الف). اما برخلاف تفاوت زیاد در الگو و رنگ پرگنه میان جدایه‌ها، ویژگی‌های ریخت‌شناسی کنیدیوم، کنیدی‌بر و پایه تفاوت معنی‌داری میان جدایه‌ها نداشت. میانگین ابعاد کنیدیوم ۵۱–۶۹ × ۳/۵–۵/۵ میکرومتر بود، پایه با میانگین طول ۱۵۱–۱۰۱ میکرومتر و در انتهای آن وزیکول بیضی‌شکل با میانگین عرض ۸/۹–۶/۴ میکرومتر تشکیل شد. میانگین‌های حاصل از اندازه‌گیری ابعاد این اندام‌ها برای جدایه‌های ایرانی این قارچ با کلید شناسایی هنریکات و کالهام (۱۱) و نیز نتایج مطالعات گسکیر و همکاران (۹) مطابقت داشت.

پس از ارزیابی نرخ رشد خطی قارچ‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشخص شد همانند الگو و رنگ پرگنه در جدایه‌های ایرانی *C. buxicola*، سرعت رشد پرگنه‌های قارچی نیز در میان جدایه‌ها متفاوت است. میانگین قطر پرگنه در این دما بین ۱/۱ تا ۲ سانتی‌متر بود و این نرخ با گزارش گسکیر و همکاران (۹) مطابقت داشت.

پس از بررسی نرخ رشد روزانه جدایه‌ها در دمای بالاتر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشخص گردید که بین افزایش دما با میزان رشد پرگنه قارچی در تمامی جدایه‌های ایرانی این قارچ ارتباط معکوس وجود دارد، بطوریکه با افزایش دما میزان رشد پرگنه قارچی کاهش می‌یابد. از خصوصیات مهم جدایه‌های *C. buxicola* رشد حداکثری آنها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و عدم توانایی آنها برای رشد در دماهای بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (۴، ۹و ۱۱). در گزارش هنریکات و کالهام (۱۱) آمده است که تمام جدایه‌های مورد بررسی آنها رشد نسبتاً خوبی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد داشتند. همچنین کروز (۴) در کتاب خود به رشد نسبتاً خوب گونه *C. buxicola* در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و عدم رشد آنها در دماهای بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان یکی از ویژگی‌هایی متمایزکننده این‌گونه اشاره‌کرده است.

همچنین در آزمون ارزیابی دمای غیرفعال شدن کنیدیوم، دمای غیرفعال شدن کنیدیوم جدایه‌ها ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. بدین ترتیب مطابق با گزارش گسکیر و همکاران (۹) اسپورزایی جدایه‌های ایرانی قارچ *C. buxicola* بسیار وابسته به دما می‌باشد و با افزایش دما

نرخ اسپورزایی و نیز جوانه‌زنی اسپورها به‌سرعت کاهش می‌یابد.

با اندازه‌گیری ابعاد ساختارهای رویشی و زایشی در ۵۲ جدایه‌ی بدست آمده از *C. buxicola*، ۲۸ جدایه که بیشترین تنوع را در ویژگی‌های مورفولوژیک داشتند انتخاب و برای ارزیابی بیماری‌زایی و سپس مطالعات مولکولی به کار گرفته شدند.

بامطالعه تنوع بیماری‌زایی در ۲۱ جدایه منتخب قارچ *C. buxicola* مشخص گردید که بین این جدایه‌ها، سطح بالایی از تنوع در علائم مربوط به بیماری بلایت شمشاد وجود دارد. اما این تنوع هیچ همبستگی با مناطق جمع‌آوری جدایه‌ها نداشت؛ بطوریکه جدایه‌های با شدت بیماری‌زایی بالا در میان جدایه‌های بدست آمده از هر سه استان شمالی کشور قابل مشاهده بود.

در تحقیق حاضر آنالیز خوشه‌ای الگوهای باندی حاصل از هریک از آغازگرهای rep به‌تنهایی قادر به تفکیک جدایه‌ها از یکدیگر به‌صورت ژنوتیپ‌های متفاوت نبود و هریک از آغازگرها به‌تنهایی تشابه بسیار بالایی را میان جدایه‌ها نشان دادند. در حالیکه اضافه نمودن الگوهای باندی حاصل از آغازگر REP به الگوهای باندی آغازگر ERIC و تجزیه‌وتحلیل ۳۵ الگوی باندی حاصله از این آغازگرها توانست تنوع ژنتیکی ۲۱ جدایه منتخب را نشان دهد. این ترکیب از آغازگرها جدایه‌ها را در سطح تشابه ۹۵ درصد به چهار گروه ژنتیکی مجزا تقسیم نمود و در هر گروه تنوعی از جدایه‌ها از استان مازندران، گیلان و گلستان جای گرفتند. این مشابهت بالای اثرانگشت DNA در بین جدایه‌ها از مناطق مختلف جغرافیایی، نشان‌دهنده وجود تعداد معدودی کلون اولیه *C. pseudonaviculata* در ایران بوده و درواقع نشان‌دهنده پیوند اپیدمیولوژیکی بالقوه و گسترش جمعیت کنونی از یک (یا حداکثر تعداد اندکی) کلون بیمارگر اولیه می‌باشد. جمع‌بندی آنکه در این پژوهش تعیین تنوع موجود در جمعیت‌های ایرانی قارچ *Cylindrocladium buxicola* به روش کلاسیک و به کمک نشانگرهای مولکولی دقیق (نشانگرهای rep) برای اولین بار در کشور صورت گرفت. براساس نتایج، تنوع بالایی چه ازنظر ریخت‌شناسی و چه ازنظر ژنتیکی بین جمعیت‌های ایرانی این قارچ وجود نداشت. همچنین ارتباطی بین اختلافات ریخت‌شناسی با اختلافات ژنتیکی مورد بررسی یافت نشد و جدایه‌هایی با ساختارهای زایشی و نیازهای دمایی مختلف دارای تشابه بالایی در الگوهای DNA خود بودند یا بالعکس. اما تنوع بیماری‌زایی بین جدایه‌های مربوط به مناطق جغرافیایی مختلف و نیز جدایه‌های مربوط به هر استان، در اتخاذ راهکار مناسب برای مبارزه با این بیمارگر باید در نظر گرفته شود. بطور مثال در انتخاب ارقام مقاوم به این‌گونه قارچی مقاومت گیاهان یک منطقه باید در برابر جدایه‌های بیمارگر همان منطقه بررسی شوند.

براساس مجموع نتایج مطالعات ریخت‌شناسی و مولکولی مشخص شد تمام جدایه‌های بدست آمده از استان‌های شمالی کشور خصوصیات تیپ اصلی گونه *Calonectria pseudonaviculta* (۹) را داشتند. بدین ترتیب جمعیت *C. pseudonaviculta* موجود در کشور برخلاف آنچه که در برخی مناطق دنیا گزارش شده است، قابل‌تفکیک به گروه‌های متمایز تاکسونومیک (گونه‌های مختلف، زیرگونه و یا واریته) نمی‌باشد. نظر به نرخ پایین تنوع میان جدایه‌ها، به نظر می‌رسد در کنترل این بیماری، استفاده از ارقام مقاوم مهمترین راهکار است.

منابع

۱- روانبخش، م.، و امینی، ط.، ۱۳۹۱. بررسی فلور، پراکنش جغرافیایی و ساختار اکولوژیکی ذخیره¬گاه جنگلی گیسوم تالش، مجله زیست‌شناسی ایران، ۱، صفحات ۲۱-۳۱.

۲- محمودی، ج.، ۱۳۸۶. بررسی تنوع گونه‌ای گیاهان جنگل حفاظت‌شده کلارآباد در سطح گروه¬های بوم-شناختی، مجله زیست‌شناسی ایران، ۴، صفحات ۳۵۳ -۳۶۲.

3- Cech, T., Diminic, D., and Heungens, K., 2010. *Cylindrocladium buxicola* causes common box blight in Croatia. Plant Pathology, 59, PP: 1169.

4- Crous, P. W., 2002. Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera. APS Press, St. Paul, Minnesota, U.S.A.

5- Crous, P. W., Janse, B. H. J., Victor, D., Marais, G. F., and Alfenas, A. C., 1993a. Characterization of some *Cylindrocladium* species with three-septate conidia using morphology, isozyme banding patterns and DNA polymorphisms. Systematic and Applied Microbiology, 16, PP: 266–273.

6- Crous, P. W., Wingfield, M. J., Alfenas, A. C., 1993b. *Cylindrocladium parasiticum* sp. nov., a new name for *C. crotalariae*, Mycological Research, 97, PP: 889–896.

7- Crous, P. W., Alfenas, A. C., Wingfield, M. J., 1993c. *Calonectria scoparia* and *Calonectria morganii* sp. nov., and variation among isolates of their *Cylindrocladium* anamorphs. Mycological Research, 97, PP: 701–708.

8- da Silva, M. A., Ferreira, J. S., Iamanaka, B. T., and Kieckbusch, T. G., 2014. Inactivation of *Aspergillus niger* in supercritical ambient applied to the sterilization of biomedical implants: procedures validation. 7th European Congress of Chemical Engineering ECCE-7.

9- Gehesquiere, B., Crouch, J. A., Marra, R. E., Van Poucke, K., Rys, F., Maes, M., Gobin, B., Höfte, M., and Heungens, K., 2015. Characterization and taxonomic reassessment of the box blight pathogen *Calonectria pseudonaviculata*, introducing *Calonectria henricotiae* sp. nov. Plant Pathology, 65, PP: 37–52.

10- Gurr, S. J., Mcpheson, M. J., and Bowles, D. J., 1992. Molecular plant pathology: a practical approach. Oxford: IRL press at Oxford University press.

11- Henricot, B., and Culham, A., 2002. *Cylindrocladium buxicola*, a new species affecting *Buxus* spp, and its phylogenetic status. Mycologia, 94(6), PP: 980-997.

12- Henricot, B., Pérez Sierra, A., and Prior, C., 2000. A new blight disease on *Buxus* in the UK caused by the fungus *Cylindrocladium*. Plant Pathology, 49, 805 p.

13- Jalili, A., and Jamzad, Z., 1999. Red Data Book of Iran: A Preliminary Survey of Endemic, Rare and Endangered Plant Species in Iran. Research Institute of Forests and Rangelands Publications, Tehran, 748 p.

14- Karimi, E., Safaei, N., and Shamsbakhsh, M., 2009. Genetic diversity and pathogenic variability of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates using rep-PCR marker. Iranian Journal of Plant Pathology, 45(3), PP: 199-212.

15- Martin, F. N., and English, J. T., 1997. Population genetics of fungal plant pathogens. Phytopathology, 87, PP: 446-447.

16- McDonald, B. A., 1997. The population genetics of fungi: Tools and techniques. Phytopathology, 87, PP: 448-453.

17- Mirabolfathy, M., 2013. Outbreak of Boxwood tree leaf drop in Guilan and Mazndaran forests. 1st Iranian Mycological Congress, University of Guilan, Rasht, Iran, 8 p.

18- Mirabolfathy, M., Ahangaran, Y., Lombard, L., and Crous, P. W., 2013. Leaf blight of *Buxus sempervirens* in northern forests of Iran caused by *Calonectria pseudonaviculata*, Plant Disease, 97(8), 1121 p.

19- Risede, J. M., and Simoneau, P., 2004. Pathogenic and genetic diversity of soilborne isolates of *Cylindrocladium* from cropping systems. European Journal of Plant Pathology, 110, PP: 139–154.

20- Shishkoff, N., Daughtrey, M., Aker, S., and Olsen, R. T., 2014. Evaluating boxwood susceptibility to *Calonectria pseudonaviculata* using cuttings from the National Boxwood Collection. Plant Health Progress, 16(1), PP: 11-15.

21- Vackar, D., Brink, B. T., Loh, J., Baillie, J. E. M., and Reyers, B., 2011. Review of multispecies indices for monitoring human impacts on biodiversity, Ecological Indicators, 17, PP: 58-67.

Phenotypic and Genotypic Diversity of Boxwood (*Buxus hyrcana* Pojark.) Blight Causal Agent Populations in Iran

Zamani S.M.[1] and Mojerlou S.[2]

[1] Assistant Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. of Iran.

[2] Assistant Prof., Dept. of Horticulture and Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, I.R. of Iran.

Abstract

Caspian boxwood (*Buxus hyrcana* Pojark.) is one of the ever green hardwoods of Caspian sea forestes which, unfortunately; is endanger of overthrow. Furthermore, several hectares of its habitats in Gilan and west of Mazandaran are exposed to Blight and excessive wilt caused by *Cylindrocladium buxicola*, recently. This fungus is serious peril for survival and generation of these trees. Certainly, identification of this fungus characteristic can be benefit in election and development of management strategies. So this research with the aim of information increment about this fungus and its population features in Iran was carried out. Firstly, phenotype properties of *C. buxicola* isolates (including morphology and disease severity), which randomly have collected from different sites of boxwood habitats, were evaluated. Then genetic variety of the isolates was evaluated by rep-PCR markers. Based on morphological assessments including shape and growth of mycelium, length, shape and the number of septates of conidia, also length and vesicle characterization of stips, 52 obtained Iranian isolates identified as *Calonectria pseudonaviculta*. 21 representative isolates were selected based on pathogenicity.These isolateds showed different levels of pathogenicity. The results of banding patterns of rep markers were analyzed together and the 21 representative isolates categorized into 4 groups at 95% similarity, and they were scattered in three provinces. This investigation furthermore revealed that all examined isolates, belonged to the authentic *Calonectria pseudonaviculta* group having main and stable morpho-physiological characteristics, so it seems that in the disease control, the use of resistant cultivars is one.

Key words: Morphology, Population genetics, Pathogenicity, *Cylindrocladium buxicola*.