مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۲، سال ۱۳۸۴ (۳۱۷-۳۰۵)

تعیین گروههای سازگاری رویشی در جمعیت قارچ *Magnaporthe grisea* در استان گیلان

صدیقه موسی نژاد[۱]، محمد جوان نیکخواه[۲] و ابراهیم محمدی گل تپه[۳]
۱، محقق مؤسسه تحقیقات برنج کشور آزمایشگاه بیماریهای برنج – رشت
۲، استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۳، عضو هیئت علمی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۲/۹

خلاصه

یکصد و هفده جدایه قارچ *Magnaporthe grisea* ، عامل بیماری بلاست برنج، شامل ۵۳ جدایه از نمونه‌های مناطق مختلف استان گیلان و ٦٤ جدایه از نمونه‌های مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج در رشت به منظور بررسی تنوع ژنتیکی قارچ بر اساس شناسایی گروههای سازگاری رویشی مورد مطالعه قرار گرفتند. گروههای سازگاری رویشی در این جمعیت‌ها با استفاده از جهش‌یافتگان فاقد قدرت استفاده از منبع نیترات شناسایی شدند. با استفاده از این روش سه گروه سازگاری رویشی به اسامی VCG1، VCG2 و VCG3 در جمعیت قارچ شناسایی شدند. گروه سازگاری رویشی VCG2 بیشترین فراوانی را در این مناطق نشان داد. بعد از آن، گروههای سازگاری رویشی VCG1 و VCG3 به ترتیب در مقام‌های دوم و سوم قرار گرفتند. در بین جدایه‌های بدست‌آمده از نمونه‌های مناطق مختلف استان، به ترتیب۴۲/۳۰٪، ٥٥/٧٦٪ و ۱/۹۲٪ از جدایه‌ها در گروههای سازگاری VCG1، VCG2 و VCG3 قرار گرفتند. همچنین ۳٤/۳۷٪، ٦۰/۹۳٪ و ٤/٦۸٪ از جدایه‌های بدست‌آمده از نمونه‌های مزرعه آزمایشی به ترتیب به گروه‌های سازگاری VCG1، VCG2 و VCG3 تعلق داشتند. در مجموع، ۳۷/۹۳٪، ٥۸/٦۲٪ و ۳/٤٤٪ از کل جدایه‌های هر دو جمعیت به ترتیب در گروههای سازگاری رویشی VCG1، VCG2 و VCG3 گروه‌بندی شدند. جدایه‌های به دست آمده از ارقام خوش‌کیفیت و محلی شامل بینام، طارم مولایی و هاشمی اعضایی از هر دو گروه سازگاری رویشی VCG1 و VCG2 بودند، در حالی که اکثر جدایه‌های بدست‌آمده از ارقام خزر و حسنی متعلق به گروه سازگاری رویشی VCG2 بودند. این تحقیق نشان داد که جمعیت قارچ در استان از نظر ژنتیکی تنوع کمی دارد. علاوه بر آن، تعیین گروه‌های سازگاری رویشی می‌تواند روش مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی قارچ باشد.

واژه‌های کلیدی: برنج، بیماری بلاست، *Magnaporthe*، گروه سازگاری رویشی، هتروکاریون.

مقدمه

تشکیل هتروکاریون بین دو فرد از یک گونه قارچی در اثر تلاقی میسلیوم‌های جدایه‌های سازگار، جزء مهمی از چرخه زندگی بسیاری از قارچها و یکی از عوامل بروز تغییرات ژنتیکی محسوب می‌گردد (۱۵). در قارچهای بیماریزای گیاهی، آنهایی که هتروکاریون تشکیل می‌دهند ممکن است از نظر قدرت تهاجمی یا دامنه میزبانی دچار تغییراتی گردند و این امر در افزایش پتانسیل بیماریزایی آنها و بقا در طبیعت مهم است. افرادی از یک جمعیت که با افراد دیگر سازگاری رویشی نشان قادر به تشکیل هتروکاریون رویشی باشند، به عنوان اعضای یک

مکاتبه کننده: محمد جوان نیکخواه e-mail: Jnikkhah@ut.ac.ir

دهند و از طریق پیوند هیفی (آناستوموز[1]) گروه سازگاری رویشی یا VCG [2] درنظر گرفته می‌شوند(۱۵). به طور کلی افرادی که دارای آلل (آلل‌های) مشابه در لوکوس‌های معروف به *het* باشند، قادر به تشکیل هتروکاریون پایدار هستند و افرادی که در این لوکوس‌ها تفاوت داشته باشند، قادر به تشکیل هتروکاریون پایدار نیستند(۱۵). بنابراین از VCG که یک مارکر چندژنی می‌باشد، در موارد زیادی برای مطالعه دینامیک جمعیت و تنوع ژنتیکی جمعیت قارچهای بیماریزای گیاهی و حتی قارچهای غیر بیماریزا استفاده شده است(۱۰،۳). لذا علاوه بر آزمایش‌های بیماریزایی و تجزیه و تحلیل‌های مولکولی، واکنش‌های فنوتیپی جدایه‌ها بعد از تلاقی روی محیط‌های غذایی معین در شرایط آزمایشگاهی نیز به عنوان روشی برای تعیین تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت قارچها به کار می‌رود. افزایش تعداد گروههای سازگاری رویشی نشان‌دهنده افزایش تنوع ژنتیکی در یک جمعیت است و تعیین گروههای سازگاری رویشی در تعیین منشأ نژادهای جدید برای یک ناحیه جغرافیایی خاص می‌تواند مفید باشد(۳، ۹، ۱۲، ۱۵).

مهمترین مورد استفاده از گروههای سازگاری رویشی برای اکثر بیماری‌شناسان گیاهی استفاده از ارتباط نزدیک این گروهها با فرم‌های مخصوص، نژادها، کلون‌ها و غیره است. در واقع به جای آزمایش‌های فراوان و وقت‌گیر بیماریزایی روی تعداد زیادی از ارقام و لاین‌های استاندارد یا انجام آزمایش‌های مولکولی پرهزینه، از همبستگی میان گروههای سازگاری رویشی و درجه بیماریزایی یا الگوی انگشت‌نگاری جدایه‌ها استفاده می‌شود(۱۵).

بلاست برنج یکی از مهمترین و شایعترین بیماریهای قارچی برنج در بیشتر مناطق برنج‌کاری دنیا می‌باشد که تحت شرایط مساعد محیطی و روی ارقام حساس موجب خسارت شدید می‌گردد. استفاده از ارقام مقاوم بیشتر از سایر روش‌ها در کنترل این بیماری مورد توجه است. تحقیقات نشان داده‌اند که قارچ عامل بلاست، *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr (آنامورف:*Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc)، از نظر ژنتیکی تغییرپذیر بوده و با تولید نژادهای بیماریزای جدید قادر است بر مقاومت میزبان غلبه نماید و طی چند سال بعد از بوجود آمدن رقم مقاوم باعث شکسته شدن مقاومت آن گردد. تغییرات ژنتیکی و ظهور نژادهای جدید قارچ به علت بروز جهش‌ها و نوترکیبی‌های ژنتیکی اتفاق می‌افتد.

در قارچ *M. grisea* نیز پدیده سازگاری رویشی مطالعه شده است (۵، ۸، ۱۱). معلوم شده این قارچ از طریق تشکیل هتروکاریون و نوترکیبی میتوزی (چرخه شبه‌جنسی[3]) موجب بروز تغییرات ژنتیکی و تولید ژنوتیپ‌های جدید می‌گردد که ممکن است منجر به افزایش دامنه میزبانی قارچ گردد(۱۱، ۱۸، ۱۹). همچنین گروههای سازگاری رویشی در *M. grisea* یک وسیله مفید برای بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های آن در مناطق جغرافیایی مختلف می‌باشد (۱۱). گنووسی و ماگیل (۱۹۷۶) و کراوفورد و همکاران (۱۹۸۶) با تلاقی دادن جهش‌یافتگان اکسوتروف ایجاد شده در اثر نور ماورای بنفش تعداد نسبتا زیادی‌از فنوتیپ‌های نوترکیب را(در اثر چرخه شبه‌جنسی) حتی در جدایه‌هایی با منشأ جغرافیایی متفاوت مشاهده کردند. در آزمایشی که با استفاده از جهش‌یافتگان اکسوتروف *M. grisea* انجام شد، جدایه‌های بدست آمده از مناطق جغرافیایی مختلف امریکا در چهار گروه سازگاری رویشی گروه‌بندی شدند(۵).

با وجود اینکه مطالعات زیادی در مورد تعیین گروههای سازگاری رویشی در جمعیت‌های *M. grisea* در دنیا صورت نگرفته است، استفاده از گروههای سازگاری رویشی به منظور تعیین تنوع ژنتیکی قارچ عامل بلاست اخیرا در ایران شروع شده است. جوان‌نیکخواه (۱۳۸۰) برای اولین بار تعداد ۸۷ جدایه از مناطق مختلف گیلان و مازندران را از طریق آزمایش‌های تکمیل‌سازی جهش‌یافتگان فاقد قدرت استفاده از منبع نیترات

1. Anastomosis
2. Vegetative compatibility group
3. Parasexual cycle

مورد آزمایش قرار دادند و چهار گروه سازگاری رویشی را شناسایی کردند. هدف از تحقیق فوق تکمیل آزمایش‌های مربوط به تعیین گروههای سازگاری رویشی *M. grisea* در استان گیلان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و نگهداری جدایه‌ها

نمونه‌های برگ و گردن خوشه آلوده به بیماری بلاست در فاصله سالهای ۱۳۷۸ تا ۱۳۸۰ از کشتزارهای برنج استان گیلان و مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور در رشت جمع‌آوری شدند. نمونه‌برداری از کشتزارهای سطح استان به صورت پراکنده از مزارع و ارقام مختلف موجود در منطقه انجام شد. نمونه‌برداری از مزرعه آزمایشی به صورت جداگانه برای ارقام بینام، طارم مولایی، هاشمی، خزر، حسنی و حسن‌سرایی صورت گرفت. نمونه‌برداری در مرحله بلاست برگ از اواخر خرداد با پیدایش لکه‌ها روی برگهای ارقام حساس شروع گردید و تا اوایل تیر ادامه داشت. نمونه‌برداری در مرحله بلاست گردن خوشه از اوایل مرداد شروع و تا پایان فصل برداشت ادامه پیدا کرد. نمونه‌ها به صورت قطعات دو تا سه سانتی‌متری درون پاکتهای کاغذی کوچک به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در معرض هوای آزمایشگاه قرار گرفتند تا خشک شوند. سپس تا مرحله جداسازی قارچ در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. نمونه‌های مربوط به هر نقطه نمونه‌برداری درون یک پاکت جداگانه قرار گرفت.

برای جداسازی و خالص‌سازی قارچ، نمونه‌های آلوده بعد از ضدعفونی سطحی با محلول ۳۰٪ هیپوکلریت سدیم تجارتی (حاوی ۱/۵٪ کلر فعال)، درون ظروف پتری و روی کاغذ صافی استریل و مرطوب (در شرایط دمای آزمایشگاه) قرار گرفتند تا قارچ عامل بیماری در محل لکه‌ها اسپورزایی کند. آنگاه سوسپانسیون رقیقی از اسپورها در آب مقطر استریل تهیه و روی محیط کشت آب-آگار ۲/۵٪ پخش گردید. بعد از یک شب تک اسپورهای جوانه‌زده روی محیط آب- آگار به کمک میکروسکوپ انتخاب و به محیط غذایی PDA[1] منتقل گردیدند.

1. Potato dextrose agar

به این ترتیب کشت تک اسپور وخالص جدایه‌ها بدست آمد که روی کاغذ صافی استریل و درون میکروتیوبهای دو میلی‌لیتری پلاستیکی یا درون ظروف شیشه‌ای پنی‌سیلین در فریزر (دمای ۲۰°C-) نگهداری شد. در مجموع ۵۳ جدایه از نمونه‌های مزارع سطح استان گیلان و ۶۴ جدایه از نمونه‌های مزرعه آزمایشی خالص‌سازی و نگهداری گردیدند.

آزمایش‌های سازگاری رویشی

جداسازی جهش‌یافتگان فاقد قدرت استفاده از منبع نیترات

به دلیل اینکه واکنش‌های سازگاری یا ناسازگاری بین جدایه‌ها به صورت ظاهری قابل مشاهده نمی‌باشد، جهش‌یافتگان *nit*[2] که قادر به استفاده از نیترات نمی‌باشند، جهت تشخیص گروههای سازگاری رویشی معرفی می‌شوند (۲، ۴، ۱۴، ۱۶، ۱۷). این جهش‌یافتگان به عنوان استرین‌های اکسوتروف مورد استفاده قرار می‌گیرند. به منظور بدست آوردن جهش‌یافتگان *nit* قطعاتی از کاغذ صافی حامل هر جدایه روی محیط PDA کشت گردید. بعد از چهار تا پنج روز در شرایط دمای آزمایشگاه (۲۶ °C - ۲۴ °C) و رشد کلنی جوان روی محیط PDA، هر جدایه به روی محیط RBA[3] منتقل گردید. برای تهیه این محیط، جوشانده ۲۰ گرم سبوس برنج (به مدت ۲۰ دقیقه) با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد و سپس ۱۵ گرم آگار به آن اضافه گردید. کشت‌ها به مدت پنج تا هفت روز در دمای آزمایشگاه و در تاریکی نگهداری شدند. سپس حلقه‌های شش میلی‌متری میسلیومی از حاشیه کلنی به روی محیط غذاییMM[4] که پنجاه گرم در لیتر کلرات پتاسیم (KClO3) به آن اضافه شده بود، منتقل شدند. این محیط غذایی به اختصار MMC نامـــگذاری شد. ترکیب محیط MM به صورت زیر است(۱۳): دکستروز، ۱۰ گرم؛ KH2PO4، ۱ گرم؛ K2HPO4، ۰/۱ گرم؛ MgSO4.7H2O، ۰/۵ گرم؛ CaCl2.H2O، ۰/۱ گرم؛ NaNO3، ۲ گرم؛ محلول ویتامین B-complex، ۱۰ میلی‌لیتر؛ محلول Trace element، ۰/۲

2. Nitrate non-utilazing mutants
3. Rice bran agar
4. Minimal medium

میلی‌لیتر؛ محلول FeSO4، ۰/۲ میلی‌لیتر؛ آب دو بار تقطیر، یک لیتر و آگار، ۱۷ گرم.

برای ساختن محلول ویتامین B-complex، ۶۰ میلی‌گرم Thiamine-HCl ، ۱۰۰ میلی‌گرم بیوتین، ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر با هم مخلوط شدند.

ترکیب محلول Trace element شامل مواد زیر است: اسیدسیتریک، ۱۰گرم؛ ZnSO4.7H2O، ۱۰ گرم؛ FeNH4(SO4)2.12H2O، ۲ گرم؛ CuSO4.5H2O، ۰/۵ گرم؛ MnSO4.H2O، ۰/۱ گرم؛ H3BO3، ۰/۱ گرم؛ NaMoO4.2H2O، ۰/۱ گرم و آب دو بار تقطیر، ۱۹۰ میلی‌لیتر.

محلول سولفات آهن نیز از مخلوط کردن ۲/۵ گرم سولفات آهن با ۲۵۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر بدست آمد. برای هر جدایه سه حلقه میسلیومی شش میلی‌متری به صورت مثلثی با فواصل مساوی روی سطح محیط MMC درون تشتک پتری هشت سانتی‌متری با سه تا پنج تکرار قرار داده شد. پتری‌ها به مدت دو تا شش هفته در دمای ۲۶-۲۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. آنگاه قطاعهای سریع‌الرشد[1] که از حلقه‌های میسلیومی منتقل شده منشعب شده بودند شناسایی و جدا گردیدند. قطاعها میسلیوم‌های مقاوم به کلرات هستند. در واقع میسلیوم‌های جدایه‌های تیپ وحشی به دلیل تبدیل کلرات به کلریت در حضور آنزیم نیترات ردوکتاز و سمیت کلریت قادر به رشد در این محیط نیستند و رشد بسیار محدودی را نشان می‌دهند. در عوض سلولهای جهش‌یافته‌ای که در آنها حداقل در یکی از ژنهای دخیل در متابولیسم نیترات جهش رخ داده باشد قادر به تبدیل کلرات به کلریت نیستند و از حاشیه کلنی محدود شده، به صورت میسلیوم‌هایی با رشد سریع نمایان می‌شوند(۴، ۶، ۷).

به ازای هر جدایه ۳۰-۲۰ قطاع مقاوم انتخاب و به روی محیط MM منتقل شدند. کشت‌ها به مدت پنج تا هفت روز در شرایط دمای آزمایشگاه و در تاریکی نگهداری شدند. کلنی‌هایی که در مقایسه با کلنی تیپ وحشی دارای رشد غیرمتراکم، گسترده و بدون میسلیوم هوایی یا با میسلیوم هوایی کم بودند به عنوان جهش‌یافتگان *nit* در نظر گرفته شدند(۴). در واقع از محیط غذایی MM به عنوان تنها منبع نیتروژن (به دلیل وجود نمک نیترات سدیم در ترکیب محیط) برای تفکیک جهش‌یافتگان nit استفاده شد.

تلاقی جهش‌یافتگان *nit* هر جدایه با یکدیگر

در این مرحله جهش‌یافتگان *nit* بدست آمده از هر جدایه از نظر امکان تلاقی با یکدیگر و تکمیل هم از نظر ژنتیکی آزمایش شدند. به ازای هر جدایه، ده جهش‌یافته برای این مرحله انتخاب و به صورت دو به دو با هم روی محیط MM تلاقی داده شدند. برای تلاقی حلقه‌های میسلیومی شش میلی‌متری از هر دو جهش یافته به فاصله حدود یک سانتی‌متر روی محیط درون تشتک‌های پتری شش سانتی‌متری قرار داده شدند. برای هر جدایه دو تا سه جهش‌یافته که قادر به تکمیل یکدیگر در هنگام تشکیل هتروکاریون بودند، انتخاب شدند. تکمیل ژنتیکی جهش‌یافتگان از طریق بوجود آمدن میسلیوم‌های هوایی متراکم (مشابه تیپ وحشی) در یک خط مشخص در ناحیه تماس میسلیوم‌های دو جهش‌یافته رشدیافته روی محیط غذایی MM تشخیص داده شد. این جهش‌یافتگان **nitX** نامگذاری شدند و تا استفاده بعدی روی قطعات کاغذ صافی استریل در فریزر نگهداری شدند.

ارزیابی خصوصیات فنوتیپی جهش‌یافتگان *nit*

جهش‌یافتگان *nit* در قارچ فوزاریوم و بسیاری از قارچهای دیگر بر اساس تعداد و نوع لوکوس‌های جهش‌یافته به سه گروه فنوتیپی مشخص تقسیم می‌شوند. بدین ترتیب در گروه اول یک جهش در لوکوس ساختمانی آنزیم احیا کننده نیترات (*nit*1)، در گروه دوم یک جهش در لوکوس اختصاصی-تنظیمی مسیر مصرف نیترات (*nit*3) و بالاخره در گروه سوم حداقل یک جهش در یکی از پنج لوکوس مؤثر در ساخت کوفاکتور دارای مولیبدن که لازمه فعالیت آنزیم احیاءکننده نیترات است (*nit*M) صورت گرفته است. شناسایی این جهش‌یافتگان روی محیط‌های غذایی واجد یکی از منابع نیتروژن، یعنی نیترات، نیتریت، هیپوزانتین[2]، آمونیوم و اسید اوریک انجام می‌گیرد.

1. Fast - growing sectors

2. Hypoxanthine

رشد ضعیف یا مشابه تیپ وحشی جهش‌یافتگان nit روی این محیط‌ها، یکی از سه نوع جهش‌یافته *nit*1، *nit*3 و *nit*M را مشخص می‌کند. در این تحقیق خصوصیات فنوتیپی جهش‌یافتگان *nit* جدایه‌های مورد آزمایش بر همین اساس تعیین گردید. محیط غذایی حاوی نیترات همان محیط غذایی MM است که حاوی نمک نیترات سدیم (NaNO3) به میزان ۲ گرم در لیتر می‌باشد. برای چهار محیط غذایی دیگر به جای نیترات سدیم به ترتیب از نیتریت سدیم (NaNO2) به میزان ۰/۲ گرم، هیپوزانتین به میزان ۰/۲ گرم، تارتارات آمونیوم ((NH4)2C4H4O6) به میزان ۱ گرم و اسید اوریک به میزان ۰/۲ گرم در لیتر استفاده شده است.

جهش‌یافتگان *nit* هر جدایه و تیپ وحشی آن روی هر یک از پنج محیط فوق درون تشتک‌های پتری هشت سانتی‌متری کشت شدند. بعد از هفت روز مورفولوژی کلنی جهش‌یافتگان در مقایسه با تیپ وحشی ارزیابی گردید و فنوتیپ هر جهش یافته تعیین شد. برای کشت، یک حلقه میسلیومی شش میلی‌متری از هر جهش‌یافته و همچنین تیپ وحشی روی سطح محیط‌های کشت مذکور قرار داده شد. این آزمایش دو بار تکرار گردید.

تعیین گروههای سازگاری رویشی

به منظور تعیین گروههای سازگاری رویشی در جمعیت *M. grisea* بایستی جهش‌یافتگان nit هر جدایه با جهش‌یافتگان *nit* تمام جدایه‌های دیگرمورد آزمایش تلاقی داده شوند. با توجه به اینکه فنوتیپ تمامی جهش‌یافتگان جداسازی شده، براساس ارزیابی نحوه رشد هر یک از آنها روی محیط‌های غذایی حاوی یکی از پنج منبع ازت تعیین شد، هنگام تلاقی جهش‌یافتگان دو جدایه بایستی از جهش‌یافتگان مکمل آنها استفاده می‌شد. در این مطالعه، به منظور کاهش تعداد تلاقی‌ها و تسهیل در امر تعیین گروههای سازگاری رویشی، از تعدادی جدایه مرجع[1] استفاده گردید. انتخاب مرجعها به این صورت انجام شد که تعدادی جدایه از ۱۵ هاپلوتیپ[2] غالب منطقه انتخاب شدند. این هاپلوتیپ‌ها به شش دودمان کلونی[3] A ، B ، C ، D ، E و F تعلق داشتند که توسط جوان‌نیکخواه (۱۳۸۰) به کمک تکنیک مولکولی rep-PCR از جمعیت قارچ در استان گیلان شناسایی شدند. جهش‌یافتگان *nit* این جدایه‌ها مانند سایر جدایه‌ها جداسازی و انتخاب شدند و تعیین فنوتیپ گردیدند. سپس جهش‌یافتگان مکمل این جدایه‌ها با یکدیگر تلاقی داده شدند. تشکیل هتروکاریون بین آنها مورد بررسی قرار گرفت و گروه‌بندی اولیه انجام شد. بدین ترتیب جدایه‌های انتخاب شده در سه گروه سازگاری رویشی قرار گرفتند، طوری که جدایه‌های متعلق به دودمان‌های کلونی A و C در یک گروه سازگاری رویشی (تحت عنوان VCG1)، جدایه‌های متعلق به سه دودمان کلونی B ، E و F در گروه سازگاری رویشی دوم (VCG2) و جدایه‌های متعلق به دودمان کلونی D در گروه سازگاری رویشی سوم (VCG3) قرار گرفتند. از گروه سازگاری رویشی VCG1 ، دو جدایه به نام‌های Rat-6 و Sht-25 به ترتیب متعلق به دودمان‌های کلونی A و C ، از گروه سازگاری رویشی VCG2 ، جدایه‌های Soa-4 ، Kon-6 ، Ash-8 و Sht-4 که به ترتیب متعلق به دودمان‌های کلونی B ، E ، F و F بودند و از گروه سازگاری رویشی VCG3 ، جدایه Rat-11 به عنوان مرجع انتخاب شدند. مشخصات این جدایه‌ها در جدول۱ ذکر شده است.

جدول۱- مشخصات جدایه‌هایی[1] که به عنوان مرجع برای تعیین گروههای سازگاری رویشی در جمعیت *Magnaporthe grisea*مورد استفاده قرار گرفتند.

نام جدایه	دودمان کلونی[2]	نوع رقم	محل جمع‌آوری	تاریخ جمع‌آوری	VCG[3]
Rat-6	A	بینام	رشت	۷۶/۵/۱۳	VCG1
Sht-25	C	بینام	شفت	۷۶/۵/۹	VCG1
Soa-4	B	بینام	صومعه‌سرا	۷۷/۵/۲۰	VCG2
Kon-6	E	دم‌زرد	کوچصفهان	۷۷/۶/۱	VCG2
Ash-8	F	بینام	آستانه	۷۷/۶/۱	VCG2
Sht-4	F	بینام	شفت	۷۷/۵/۱۸	VCG2
Rat-11	D	نامشخص	رشت	۷۸/۶/۳	VCG3

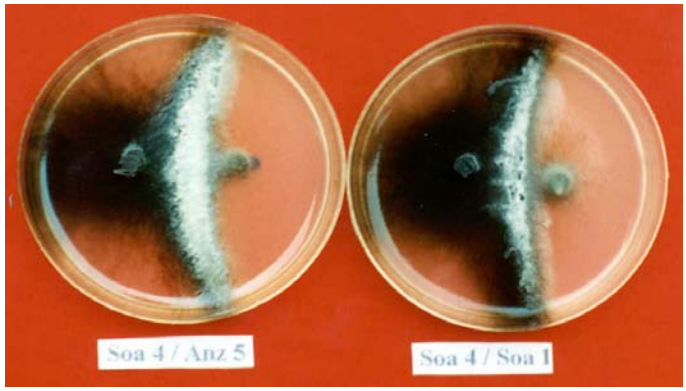
۱- تمامی جدایه‌های مرجع از گردن خوشه جدا شدند.

۲- دودمانهای کلونی به کمک تکنیک rep-PCR شناسایی شدند(۱).

۳- گروه سازگاری رویشی که بر اساس هر جدایه مرجع شناسایی گردید.

1. Tester isolate
2. Haplotype
3. Clonal lineage

برای تعیین گروههای سازگاری رویشی، جهش‌یافتگان nit بدست آمده از جدایه‌های مرجع با جهش‌یافتگان nit همه جدایه‌های مورد آزمایش تلاقی داده شدند. بدین منظور از جهش‌یافتگان مکمل دو جدایه استفاده گردید. حلقه‌های میسلیومی شش میلی‌متری از هر دو جهش‌یافته (جهش یافته جدایه مرجع و جهش‌یافته جدایه مورد مطالعه) روی محیط غذایی MM درون تشتک‌های پتری هشت سانتی‌متری با فاصله حدود دو سانتی‌متر قرار داده شدند. فرآیند به هم رسیدن میسلیوم‌ها و تشکیل هتروکاریون به طور روزانه به مدت حدود بیست روز ارزیابی شد. در صورت تشکیل هتروکاریون، تکمیل ژنتیکی دو جهش‌یافته و بروز رشد طبیعی قارچ (رشد تیپ وحشی) در ناحیه تماس میسلیوم‌ها، جدایه مورد مطالعه در گروه سازگاری رویشی مربوط به جدایه مرجع قرار گرفت (شکل ۱). هر آزمایش تلاقی دوبار تکرار گردید.



شکل ۱- تشکیل هتروکاریون در اثر تلاقی جهش یافته جدایه مرجع Soa 4 با دو جدایه Soa 1 و Anz 5. با این تلاقی دوجدایه در گروه سازگاری VCG2 گروهبندی شدند.

نتایج

جداسازی جهش‌یافتگان *nit*

توانایی جدایه‌های *M. grisea* برای تولید قطاعهای سریع‌الرشد مقاوم به کلرات روی محیط MMC و سرعت رشد قطاعها از اطراف حلقه‌های میسلیومی بسیار متفاوت بود. تعدادی از جدایه‌ها در حدود دو هفته بعد از کشت روی محیط MMC تولید قطاعهای مقاوم به کلرات کردند که به راحتی قابل جداسازی بودند، در حالی که تولید چنین قطاعهایی برای تعدادی دیگر از جدایه‌ها به زمانی طولانی‌تر (حدود پنج تا شش هفته) نیاز داشت.

حتی نحوه رشد قطاعهای مقاوم به کلرات و پراکندگی آنها در اطراف حلقه‌های میسلیومی برای تمام جدایه‌ها مشابه نبود. در بعضی جدایه‌ها قطاعها کاملا مجزا بودند در حالی که در جدایه‌های دیگر یک قطاع سریع‌الرشد به صورت هاله‌ای با رشد یکنواخت اطراف حلقه میسلیومی را فرا می‌گرفت. در بعضی جدایه‌ها نیز قطاعها به سختی قابل شناسایی و تفکیک بودند. در مواقعی که آزمایش تکرار گردید، نحوه رشد قطاعها تفاوت چندانی پیدا نکرد. میسلیوم‌های مربوط به تیپ وحشی هر جدایه به صورت یک هاله بسیار کندرشد در اطراف حلقه‌های میسلیومی منتقل شده روی محیط MMC دیده می‌شدند.

قطاعهای سریع‌الرشد به محیط MM منتقل شدند. تقریبا در تمامی موارد قطاعهای منتقل‌شده روی محیط MM جهش‌یافتگان فاقد قدرت استفاده از منبع نیترات بودند که در مقایسه با تیپ وحشی دارای کلنی گسترده، غیر متراکم و فاقد میسلیوم هوایی یا با میسلیوم هوایی کم بودند. تیپ وحشی هر جدایه روی محیط MM دارای کلنی معمولی با میسلیوم هوایی و رشد متراکم بود. جهش‌یافتگان nit هر جدایه و تیپ وحشی آن روی محیط PDA کلنی‌های تقریبا مشابهی را تولید کردند که تنها اندکی از لحاظ سرعت رشد و قطر کلنی با یکدیگر تفاوت داشتند.

تلاقی جهش‌یافتگان nit هر جدایه با یکدیگر

به کمک تلاقی جهش‌یافتگان nit، برای هر جدایه دو یا بیشتر جهش‌یافته مکمل شناسایی و تحت عنوان nitX روی کاغذ صافی در فریزر نگهداری گردیدند. برای تعدادی از جدایه‌ها نیز هیچکدام از جهش‌یافتگان *nit* جداسازی شده قادر به تکمیل ژنتیکی یکدیگر نبودند و تشکیل هتروکاریون بین آنها قابل مشاهده نبود، لذا فقط یکی از جهش‌یافتگان *nit* نگهداری گردید.

ارزیابی خصوصیات فنوتیپی جهش‌یافتگان *nit*

اکثر جهش‌یافتگان *nit* جداسازی شده از جدایه‌های مورد مطالعه و تمامی جهش‌یافتگان *nit* جدایه‌های مرجع از نوع *nit*M بوده که حداقل در یکی از ژنها از مجموعه ژنهای مسؤول

ساخت کوفاکتور دارای مولیبدن دچار جهش شده بودند. این چنین جهش‌یافتگانی روی محیط‌های حاوی نیترات و هیپوزانتین بر خلاف تیپ وحشی خود دارای کلنی گسترده، غیر متراکم و فاقد میسلیوم هوایی بودند، اما روی محیط‌های حاوی نیتریت، تارتارات آمونیوم و اسید اوریک رشدی مشابه تیپ وحشی از خود نشان دادند. تعداد کمی از جهش‌یافتگان نیز از نوع *nit*1 بودند که روی تمامی محیط‌های غذایی مورد استفاده به جز محیط حاوی نیترات دارای رشدی مشابه تیپ وحشی بودند. هیچ جهش‌یافته‌ای از نوع *nit*3 در این مطالعه مشاهده نشد.

تعیین گروههای سازگاری رویشی

نتایج حاصل از تلاقی جهش‌یافتگان *nit* جدایه‌های مورد مطالعه با جهش‌یافتگان *nit* جدایه‌های مرجع نشان داد که جمعیت *M. grisea* در استان گیلان [جدایه‌های متعلق به نمونه‌های جمع‌آوری شده از نقاط مختلف استان گیلان (۵۳ جدایه) و جدایه‌های متعلق به نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج] در همان سه گروه سازگاری رویشی جدایه‌های مرجع (VCG1 ، VCG2 و VCG3) قرار می‌گیرند. فراوانی هر یک از گروههای سازگاری رویشی در این دو گروه از جدایه‌های *M. grisea* در جدول ۲ ذکر شده است. بیشترین فراوانی در هر جمعیت متعلق به گروه VCG2 می‌باشد طوری که ۵۵/۷۶٪ از جدایه‌های نمونه‌های نقاط مختلف استان گیلان و۶۰/۹۳٪ از جدایه‌های نمونه‌های مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج به این گروه سازگاری رویشی تعلق داشتند. بعد از آن، گروه VCG1 در مقام دوم قرار دارد طوری که ۴۲/۳۰٪ از جدایه‌های نمونه‌های نقاط مختلف استان گیلان و۳۴/۳۷٪ از جدایه‌های نمونه‌های مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج در این گروه قرار گرفتند. تعداد بسیار اندکی از جدایه‌ها یعنی ۱/۹۲٪ از جدایه‌های نمونه‌های نقاط مختلف استان گیلان و۴/۶۸٪ جدایه‌های نمونه‌های مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج در گروه سازگاری رویشی VCG3 قرار گرفتند.

جدایه‌های بدست آمده از نقاط مختلف استان گیلان از ده رقم مختلف جداسازی شدند (جدول ۳). البته لازم به ذکر است که این جدایه‌ها به طور عمده از ارقام بینام، طارم‌مولایی، هاشمی و خزر بدست آمده بودند و تعداد اندکی از جدایه‌ها از شش رقم حسنی، حسن‌سرایی، علی‌کاظمی، دم‌سیاه، دم‌سرخ و دم‌زرد جداسازی شده و بقیه جدایه‌ها نیز از ارقام نامشخصی جداسازی شده بودند. جدول‌های ۳ و ۴ به ترتیب فراوانی هر یک از گروههای سازگاری رویشی در جمعیت *M. grisea* از مزارع سطح استان گیلان و مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج را به تفکیک ارقامی که نمونه‌برداری از آنها انجام شده است نشان می‌دهند. با نگاهی دقیق به جدول‌های ۳ و۴ درمی‌یابیم که ارقام خوش‌کیفیت و محلی استان شامل بینام، طارم‌مولایی و هاشمی توسط اعضایی از هر دو گروه VCG1 و VCG2 مورد حمله قرار می‌گیرند. اکثر جدایه‌هایی که از ارقام خزر و حسنی جداسازی شده بودند متعلق به گروه VCG2 بودند. در مورد ارقام حسن‌سرایی، علی‌کاظمی، دم‌سیاه، دم‌سرخ و دم‌زرد و همچنین در مورد گروه VCG3 به دلیل کم بودن تعداد جدایه‌ها نمی‌توان با اطمینان سخن گفت. تفاوت بین فراوانی سه گروه VCG1، VCG2 و VCG3 روی پنج رقم از شش رقم نمونه‌برداری شده در مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج در شکل ۲ به تصویر کشیده شده است.

جدول ۵ فراوانی هر یک از گروههای سازگاری رویشی را در جمعیت *M. grisea* از استان گیلان به تفکیک شهر یا بخش محل جمع‌آوری نمونه‌های آلوده به بلاست که جدایه‌ها از آنها جداسازی شده‌اند، نشان می‌دهد. گروه VCG2 در اکثر شهرها یا بخش‌ها از فراوانی بیشتری نسبت به گروه VCG1 برخوردار بود که این مسئله با توجه به فراوانی بالای این گروه در جمعیت *M. grisea* در کل استان، کاملا طبیعی است. اما چند نکته‌ای که در این جدول باید به آن توجه کرد این است که جدایه‌های *M. grisea* که از نمونه‌های جمع‌آوری شده از رشت یا بخش نزدیک و تابعه رشت یعنی کوچصفهان جداسازی شده بودند اکثرا متعلق به گروه VCG1 بودند. همچنین جدایه‌هایی که از نمونه‌های جمع‌آوری شده از بخش لشت‌نشاء یا شهرستان‌های صومعه‌سرا و فومن جداسازی شده بودند اکثرا از گروه VCG2 بودند. در مورد بقیه شهرها یا بخش‌ها تفاوتها به دلیل کم بودن تعداد جدایه‌ها واضح نبودند یا اینکه تفاوت

زیادی در فراوانی هر یک از گروههای سازگاری رویشی در آن مناطق وجود نداشت.

جدول ۲- فراوانی گروههای سازگاری رویشی *Magnaporthe grisea* در مناطق مختلف استان گیلان و مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج.

ردیف	محل جمع‌آوری	تعداد جدایه[1]	گروه سازگاری رویشی VCG1	گروه سازگاری رویشی VCG2	گروه سازگاری رویشی VCG3
۱	نقاط مختلف استان گیلان	۵۲	۲۲(٪۴۲/۳۰)	۲۹(٪۵۵/۷۶)	۱(٪۱/۹۲)
۲	مزرعه آزمایشی	۶۴	۲۲(٪۳۴/۳۷)	۳۹(٪۶۰/۹۳)	۳(٪۴/۶۸)
۳	مجموع جدایه‌ها	۱۱۶	۴۴(٪۳۷/۹۳)	۶۸(٪۵۸/۶۲)	۴(٪۳/۴۴)

[1] تعداد ۵۳ جدایه از مجموع جدایه‌های جمع‌آوری شده از نقاط مختلف استان گیلان در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند، اما برای یک جدایه هیچ جهش‌یافته‌ای جداسازی نشد لذا در جدول فوق تعداد جدایه‌ها ۵۲ ذکر شده است.

جدول ۳- فراوانی هر یک از سه گروه سازگاری رویشی در جمعیت *Magnaporthe grisea* از مزارع سطح استان گیلان به تفکیک ارقامی که نمونه‌برداری از آنها انجام شده است.

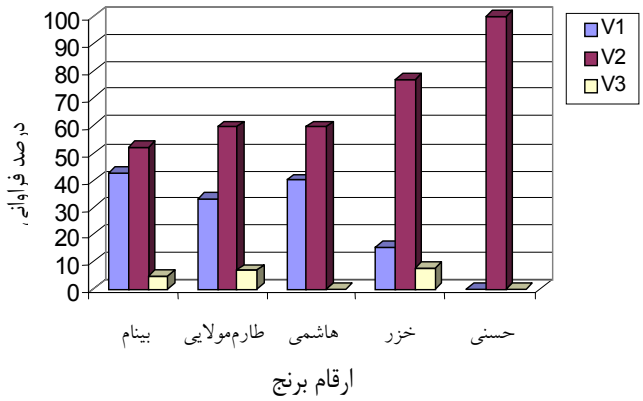
ردیف	نوع رقم	تعداد جدایه	گروه سازگاری رویشی VCG1	گروه سازگاری رویشی VCG2	گروه سازگاری رویشی VCG3
۱	بینام	۱۵	۶	۹	-
۲	طارم‌مولایی	۱	-	۱	-
۳	هاشمی	۱۳	۷	۶	-
۴	خزر	۲	-	۲	-
۵	حسنی	۱	-	۱	-
۶	حسن‌سرایی	۲	۱	۱	-
۷	علی‌کاظمی	۲	۱	-	۱
۸	دم‌سیاه	۳	۱	۲	-
۹	دم‌سرخ	۲	۲	-	-
۱۰	دم‌زرد	۳	۱	۲	-
۱۱	نامشخص	۸	۳	۵	-

بحث

در این مطالعه به کمک محیط غذایی حاوی کلرات پتاسیم، جهش‌یافتگان مقاوم به کلرات که فاقد قدرت استفاده از منبع نیترات بودند جداسازی شدند. این جهش‌یافتگان که در آنها حداقل یکی از ژنهای دخیل در متابولیسم نیترات دچار جهش خود به خودی شده است، در طبیعت وجود دارند. در واقع محیط کلرات پتاسیم تنها برای جداسازی و تفکیک هسته‌های جهش‌یافته از هسته‌های تیپ وحشی در میسلیوم‌های یک جدایه استفاده می‌گردد. همان طوری که ذکر گردید، توانایی تولید قطاعهای سریع‌الرشد مقاوم به کلرات روی محیط MMC، برای تمام جدایه‌ها یکسان نیست و نحوه رشد قطاعها و پراکندگی آنها در اطراف حلقه‌های میسلیومی منتقل شده روی محیط متفاوت است. تنوع قطاعهای تولید شده در اطراف حلقه‌های میسلیومی در بین جدایه‌ها احتمالا به دلیل تفاوتهای موجود بین جهش‌های به وقوع پیوسته است. اگر قطاعهای تولید شده از جدایه‌ای از تنوع بیشتری برخوردار باشند، غالبا فنوتیپ جهش‌یافتگان تولید شده از آن جدایه از جدایه‌ای که قطاعی سریع‌الرشد به حالت هاله‌ای با رشد یکنواخت اطراف حلقه‌های میسلیومی را فرا گرفته است، از تنوع بیشتری برخوردار است.

جدول ۴- فراوانی هر یک از سه گروه سازگاری رویشی در جمعیت *Magnaporthe grisea* از مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج به تفکیک ارقامی که نمونه‌برداری از آنها انجام شده است.

ردیف	نوع رقم	تعداد جدایه	گروه سازگاری رویشی VCG1	گروه سازگاری رویشی VCG2	گروه سازگاری رویشی VCG3
۱	بینام	۲۱	۱۱(٪۴۲/۸۵)	۹(٪۵۲/۳۸)	۱(٪۴/۷۶)
۲	طارم‌مولایی	۱۵	۵(٪۳۳/۳۳)	۹(٪۶۰/۰۰)	۱(٪۶/۶۶)
۳	هاشمی	۱۰	۴(٪۴۰/۰۰)	۶(٪۶۰/۰۰)	-
۴	خزر	۱۳	۲(٪۱۵/۳۸)	۱۰(٪۷۶/۹۲)	۱(٪۷/۶۹)
۵	حسنی	۴	-	۴(٪۱۰۰/۰۰)	-
۶	حسن‌سرایی	۱	-	۱	-



شکل ۲- فراوانی هر یک از گروههای سازگاری رویشی در جمعیت *Magnaporthe grisea* از مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج به تفکیک پنج رقم عمده که نمونه‌برداری از آنها انجام شده است.

جدول ۵ - فراوانی هر یک از گروههای سازگاری رویشی در جمعیت *Magnaporthe grisea* از استان گیلان به تفکیک شهر یا بخشی که نمونه‌برداری از آن انجام شده است.

ردیف	محل نمونه‌برداری	تعداد جدایه	گروه سازگاری رویشی VCG1	گروه سازگاری رویشی VCG2	گروه سازگاری رویشی VCG3
۱	شفت	۵	۲	۳	-
۲	فومن	۶	۲	۴	-
۳	آستانه اشرفیه	۲	۱	۱	-
۴	ماسال	۲	۱	۱	-
۵	لشت‌نشاء	۶	۲	۴	-
۶	سیاهکل	۲	۱	۱	-
۷	رشت	۴	۳	۱	-
۸	خشکبیجار	۱	-	۱	-
۹	صومعه‌سرا	۴	۱	۳	-
۱۰	رستم‌آباد	۱	-	۱	-
۱۱	سنگر	۱	-	۱	-
۱۲	کوچصفهان	۱۰	۶	۴	-
۱۳	تالش	۱	-	۱	-
۱۴	انزلی	۳	۲	۱	-
۱۵	رضوانشهر	۱	-	۱	-
۱۶	لنگرود	۱	-	۱	-
۱۷	آستارا	۱	۱	-	-
۱۸	خمام	۱	-	-	۱
۱۹	مزرعه‌آزمایشی	۶۴	۲۲	۳۹	۳

البته این امکان نیز وجود دارد که چند قطاع تولید شده از اطراف یک حلقه میسلیومی از یک فنوتیپ باشند. هر چه تعداد قطاعهای تولید شده از اطراف حلقه‌های میسلیومی بیشتر و تفکیک آنها راحتتر باشد، امکان جداسازی جهش‌یافتگان مکمل (از دو فنوتیپ مختلف) بیشتر است.

نتایج حاصل از تلاقی جهش‌یافتگان *nit* هر جدایه با یکدیگر نشان داد که بیش از نود درصد جهش‌یافتگان *nit* از گروه nitM و بقیه جهش‌یافتگان نیز از نوع nit1 بودند. هیچ جهش‌یافته‌ای از نوع nit3 در این جهش‌یافتگان مشاهده نشد. این نتایج بر پایداری بالای لوکوس ساختمانی آنزیم احیاءکننده نیترات و لوکوس اختصاصی- تنظیمی مسیر مصرف نیترات و جهش‌پذیری اندک آنها تأکید می‌کند، در حالی که ژنهای مسؤول ساخت کوفاکتور دارای مولیبدن از جهش‌پذیری بالایی برخوردار هستند، لذا اکثر جهش‌یافتگان از نوع nitM بوده‌اند.

همان طوری که قبلا نیز ذکر گردید، ژنهای دخیل در امر متابولیسم نیتروژن در *M. grisea* مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند و مطالعات اندکی در زمینه تعیین گروههای سازگاری رویشی در این قارچ صورت گرفته است (۵، ۸، ۱۱). لذا تعیین فنوتیپ و گروه‌بندی جهش‌یافتگان *nit* بدست آمده از جدایه‌های *M. grisea* تنها براساس مطالعات انجام گرفته در سایر قارچها می‌باشد و گمان می‌رود که ژنهایی مشابه آنچه که در جنس‌های *Fusarium* ، *Neurospora* و *Aspergillus* وجود دارند در *M. grisea* نیز وجود داشته و در فرآیند متابولیسم نیتروژن نقش داشته باشند(۴).

تلاقی جهش‌یافتگان *nit* جدایه‌های مورد مطالعه با جهش‌یافتگان جدایه‌های مرجع نشان داد که سه گروه سازگاری رویشی در جمعیت *M. grisea* در استان گیلان وجود دارد. با توجه به نحوه انتخاب جدایه‌های مرجع در این آزمایش افرادی که در گروه سازگاری رویشی VCG1 قرار گرفتند احتمالا اعضایی از دودمان‌های کلونی A یا C هستند و اعضایی که در گروه سازگاری رویشی VCG2 قرار گرفتند احتمالا اعضایی از دودمان‌های کلونی F ، B یا E و اعضای گروه سازگاری رویشی VCG3 اعضای کلون D هستند. این نتایج بسیار مشابه نتایج بدست آمده توسط جوان‌نیکخواه (۱۳۸۰) می‌باشد. ایشان نتیجه گرفتند که جمعیت *M. grisea* در استان گیلان به چهار گروه سازگاری رویشی (به نامهای IR1 ، IR2 ، IR3 و IR4) تقسیم می‌شود. از ۸۷ جدایه مطالعه شده توسط ایشان، ۲۷ جدایه در گروه سازگاری رویشی IR1، ۶ جدایه در گروه سازگاری رویشی IR2 ، ۷ جدایه در گروه سازگاری رویشی IR3 و ۳۸ جدایه در گروه سازگاری رویشی IR4 قرار گرفتند و ۹ جدایه نیز در هیچکدام از این چهار گروه سازگاری قرار نگرفتند. نتیجه بدست‌آمده هماهنگی زیادی را با گروهبندی جدایه‌های قارچ بر اساس انگشت نگاری DNA جدایه‌ها به کمک تکنیک rep-PCR نشان داد. در این تحقیق گروه سازگاری رویشی VCG1 منطبق بر گروه سازگاری رویشی IR1 ، گروه سازگاری رویشی VCG2 منطبق بر گروه سازگاری رویشی IR4 و گروه سازگاری رویشی VCG3 منطبق بر گروه سازگاری IR2 می‌باشد. گروه سازگاری رویشی IR3 در مطالعه

انجام شده توسط جوان‌نیکخواه، شامل اعضایی که از دودمان‌های کلونی A ، E و F می‌باشد که در یک گروه سازگاری رویشی مجزا قرار گرفته‌اند. چنین گروهی در مطالعه حاضر شناسایی نشد.

بر اساس مطالعات مولکولی جوان‌نیکخواه(۱۳۸۰)، دودمانهای کلونی A ، B ، C ، D ، E و F به ترتیب ۲۸ ، ۱/۷، ۱/۷، ۳/۲ ، ۳/۴ و ۶۲ درصد از جدایه‌های *M. grisea* را در مناطق شمالی کشور به خود اختصاص دادند که این مطلب توسط گروههای سازگاری شناسایی شده نیز تا حد زیادی قابل بیان می‌باشد. دودمان‌های کلونی از طریق انگشت‌نگاری DNA جدایه‌های قارچ به کمک تکنیک مولکولی rep-PCR با استفاده از آغازگرهای توالی تکرار شونده Pot2 شناسایی شدند. این مطالعات حاکی از جمعیت پائین دودمان کلونی D در نواحی شمالی کشور می‌باشد که این مسئله توسط گروه سازگاری رویشی VCG3 به تأیید رسیده است. ممکن است که گروه سازگاری رویشی VCG3 به تازگی در مناطق شمالی کشور ظهور یافته باشد یا گروهی قدیمی است که به دلایلی نظیر ترجیح میزبانی یا توانایی رقابت محدود با دو گروه سازگاری رویشی VCG1 و VCG2 برای آلودگی ارقام موجود در منطقه، فرصت تکثیر و گسترش را پیدا نکرده است.

ارقام بومی و مرغوب استان گیلان شامل بینام، طارم‌مولایی و هاشمی توسط اعضایی از هر دو گروه سازگاری رویشی VCG1 و VCG2 مورد حمله قرار می‌گیرند. براساس مطالعات مولکولی جوان‌نیکخواه (۱۳۸۰) مشخص شد که ارقامی نظیر بینام، طارم‌مولایی و هاشمی توسط جدایه‌هایی از چند دودمان کلونی از مجموع دودمان‌های کلونی ششگانه خصوصا دودمان‌های A و F مورد حمله قرار می‌گیرند، لذا اعضایی از هر دو گروه سازگاری رویشی VCG1 و VCG2 از روی این ارقام جداسازی شده‌اند. به نظر می‌رسد جدایه‌هایی از تمامی دودمان‌ها خصوصا دودمان‌های A و F غالبا دارای ژنها یا آلل‌های بیماریزایی روی این ارقام می‌باشند. با توجه به اینکه ارقامی نظیر بینام و طارم‌مولایی از قدیمی‌ترین ارقام منطقه بوده و رقم هاشمی نیز حاصل تغییرات و اصلاحات انجام شده روی این ارقام می‌باشد، این مسئله خیلی دور از انتظار نیست. اکثر جدایه‌هایی که از ارقام خزر و حسنی جداسازی شده بودند متعلق به گروه سازگاری رویشی VCG2 بودند. با مراجعه به مطالعات مولکولی جوان‌نیکخواه (۱۳۸۰) معلوم گردید که تمامی جدایه‌های بدست آمده از ارقام خزر و حسنی در دودمان کلونی F قرار گرفته‌اند، لذا به نظر می‌رسد بیماریزایی روی این ارقام غالبا به افراد و جدایه‌هایی از دودمان کلونی F (گروه سازگاری رویشی VCG2) محدود می‌شود. این احتمال وجود دارد که اعضای هر دو گروه سازگاری رویشی VCG1 و VCG2 دارای ژنها یا آلل‌های بیماریزایی روی تمامی این ارقام باشند، اما قدرت رقابت متفاوت در این گروههای سازگاری برای آلودگی ارقام یا ترجیح میزبانی منجر به اختلاف زیاد در درصد فراوانی آنها در مناطق شمالی کشور شده باشد.

با توجه به اینکه جدایه‌های متعلق به گروه سازگاری رویشی VCG2 قادر به آلوده‌سازی اغلب ارقامی هستند که در کشتزارهای مناطق شمالی کشور کشت می‌شوند، امکان گسترش و تکثیر آنها به راحتی در این مناطق وجود دارد. لذا این گروه از جمعیت بالایی برخوردار می‌باشد. اعضای گروه سازگاری رویشی VCG1 روی تعدادی از ارقام رایج این مناطق بیماریزا هستند، ارقامی که از دیر باز در این مناطق کشت می‌شدند، لذا این گروه نیز از جمعیت نسبتا بالایی برخوردار می‌باشد.

گروههای سازگاری رویشی VCG1 و VCG2 در اکثر شهرها و مناطق از فراوانی بالایی برخوردار بودند. با نگاهی به مطالعات مولکولی جوان‌نیکخواه (۱۳۸۰) متوجه می‌شویم که دودمان‌های کلونی A و F نیز در اکثر مناطق از فراوانی بسیار بالایی برخوردار بودند. همچنین در اغلب مناطق دودمان کلونی F (گروه سازگاری رویشی VCG2) از فراوانی بیشتری نسبت به دودمان کلونی A (گروه سازگاری VCG1) برخوردار بود.

جدایه‌های *M. grisea* که از نمونه‌های جمع‌آوری شده از رشت یا بخش نزدیک به آن مانند کوچصفهان جداسازی شده بودند اکثرا متعلق به گروه سازگاری رویشی VCG1 بودند. این مسئله به دلیل کشت وسیع رقم بینام در زمان نمونه‌برداری در این مناطق بوده است. جدایه‌هایی که از نمونه‌های جمع‌آوری شده از بخش لشت‌نشاء یا شهرستان‌های صومعه‌سرا و فومن

جداسازی شده بودند اکثرا از گروه سازگاری رویشی VCG2 بودند که با توجه به کشت وسیع رقم هاشمی در این مناطق دور از انتظار نیست. این امکان وجود دارد که اختلاف بین فراوانی دو گروه سازگاری رویشی در این مناطق با مطالعه تعداد بیشتر جدایه‌ها تغییر حاصل کند.

با توجه به نتایج حاصل از تعیین گروههای سازگاری رویشی در جمعیت *M. grisea* از استان گیلان و رابطه مستقیم و نزدیک این گروهها با دودمان‌های کلونی ششگانه موجود در جمعیت و رابطه غیرمستقیم آن با بیماریزایی جدایه‌ها روی ارقام مختلف موجود در منطقه، می‌توان چنین عنوان کرد که تعیین گروههای سازگاری رویشی در جمعیت *M. grisea* در یک منطقه جغرافیایی به میزان بالایی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت *M. grisea* در آن منطقه می باشد و پراکندگی گروههای سازگاری رویشی در مناطق مختلف و روی ارقام مختلف و فراوانی آنها می‌تواند نمایی از وضعیت پراکندگی دودمان‌های کلونی در مناطق مختلف و روی ارقام مختلف و فراوانی آنها باشد. تنها اشکالی که در اینجا وجود دارد این است که شش دودمان کلونی موجود در جمعیت *M. grisea* در نواحی شمالی کشور در سه گروه سازگاری رویشی قرار می‌گیرند و لذا امکان جداسازی و تفکیک دودمان کلونی A از دودمان کلونی C و دودمان کلونی F از دودمان‌های کلونی E یا B با توجه به نتایج آزمایش‌های تعیین گروههای سازگاری رویشی وجود ندارد.

همان طور که در این آزمایش دیده شد، تنوع مشاهده شده به کمک روش تعیین گروههای سازگاری رویشی بسیار نزدیک به تنوع مشاهده شده در جدایه‌های قارچ به کمک تکنیک مولکولی می‌باشد. به خصوص برای دو دودمان کلونی بزرگ و غالب منطقه یعنی A و F، تعیین گروههای سازگاری رویشی نشان داد که این دو دودمان از نظر ژنتیکی کاملا متفاوت هستند و احتمالا دو مسیر تکاملی متفاوت را پیموده‌اند (۱).

تاکنون استفاده از گروههای سازگاری رویشی روش مناسبی برای گروه‌بندی جمعیت قارچهای بیماریزای گیاهی و ارزیابی ارتباط بین جدایه‌ها بوده است(۱۵). گروههای سازگاری رویشی (VCGs) یک مارکر چند ژنی مؤثر است که برای ایجاد یک چهارچوب ژنتیکی جهت کمک به تشریح نتایج بدست آمده از کاربرد تکنیک‌های مولکولی و تنوع مولکولی دیده شده در قارچها بسیار مفید است، لذا کاربرد این روش در کمک به ارزیابی بیشتر و تشریح تنوع دیده شده در درون یا بین جمعیت‌های بلاست برنج می‌تواند کمک خوبی در همه جای دنیا باشد. حتی در بعضی از آزمایشگاه‌ها که امکانات کافی برای تجزیه و تحلیل مولکولی جدایه‌های قارچ وجود ندارد، استفاده از این روش در تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌ها بسیار مفید است.

اطلاعات دقیق‌تر در رابطه با تنوع ژنتیکی *M. grisea* در استان گیلان و همچنین تعیین رابطه دقیق بین دودمان‌های کلونی، گروههای سازگاری رویشی و نژادهای فیزیولوژیک نیازمند مطالعه تعداد بیشتر جدایه‌ها از مناطق و ارقام مختلف به کمک تکنیک‌های مولکولی، تعیین گروههای سازگاری رویشی و آزمایش‌های بیماریزایی می‌باشد. نمونه‌برداری‌های مداوم طی سالهای آتی و تکرار آزمایش‌های فوق اطلاعات مفیدی را درباره دینامیک جمعیت و تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در جمعیت ارائه خواهد نمود.

سپاسگزاری

نگارندگان از مسؤولین محترم مؤسسه تحقیقات برنج کشور به خاطر فراهم آوردن امکانات لازم صمیمانه تشکر می‌نمایند. هزینه انجام این تحقیق از محل اعتبارات طرح شماره ۰۰۴ - ۸۱ - ۱۸ - ۱۰۰ مؤسسه فوق تأمین شده است.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱. جوان‌نیکخواه، م. ۱۳۸۰. تحقیق روی تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr، عامل بیماری بلاست برنج، با استفاده از خصوصیات مولکولی، بیماریزایی و سازگاری رویشی در استان گیلان. پایان‌نامه دکتری رشته قارچ‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران. ۱۷۰ صفحه.

2. Bayman, F. & P. J. Cotty. 1991. Improved media for selecting nitrate-non utilizing mutants in *Aspergillus flavus*. Mycologia, Vol. 83: 311-316.

3. Chen, W. 1994.Vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* from ornamental woody plants. Phytopathology, Vol. 84: 214-219.
4. Correll, J. C., C. I. R. Klittich & J. F. Leslie. 1987. Nitrate non utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. Phytopathology, Vol. **77**: 1640-1646.
5. Correll, J. C. & F. N. Lee. 1999. Relationship of races, DNA fingerprint groups, vegetative compatibility groups and mating type among isolates of rice blast pathogen *Pyricularia grisea* in Arkansas. In: Wells rice research studies. Eds., Norman, R. J. & C. A. Beyrouty, pp.189-200. Fayetteville, Arkansas, U.S.A.
6. Cove, D. J. 1976a. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: Studies of mutants altered in nitrate assimilation. Molecular Genetics and Genomes, Vol. 146: 147-159.
7. Cove, D. J. 1976b. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: The selection and characterization of chlorate resistant mutants. Heredity, Vol. 36: 191-203.
8. Crowford, M. S., F. C. Chumley, C. G. Weaver & B. Valent. 1986. Characterization of the heterokaryotic and vegetative diploid phases of *Magnaporthe grisea*. Genetics, Vol. 114: 1111-1129.
9. Elias, K. S. & R. W. Schneider. 1991. Vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici.* Phytopathology, Vol. 81: 159-162.
10. Elias, K. S., R. W. Schneider & M. M. Lear. 1991. Analysis of vegetative compatibility groups in non pathogenic population of *Fusarium oxysporum* isolated from symptomless tomato roots. Canadian Journal of Botany, Vol. 69: 2089- 2094.
11. Genovesi, A. D. & C. W. Magill. 1976. Heterokaryosis and parasexuality in *Pyricularia oryzae* Cavara. Canadian Journal of Microbiology, Vol. 22: 531-536.
12. Glass, N. L. & G. A. Kuldau. 1992. Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. Annual Review of Phytopathology, Vol. 30: 204-224.
13. Harp, T. L. & J. C. Correll. 1998. Recovery and characterization of spontaneous, selenate-resistant mutants of *Magnaporthe grisea*, the rice blast pathogen. Mycologia, Vol. 90: 954-963.
14. Klittich, C. I. R. & J. F. Leslie. 1988. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme (Gibberella fujikuroi)*. Genetics, Vol. 118: 417-423.
15. Leslie, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. Annual Review of Phytopathology, Vol. 31: 127-151.
16. Papa, K. E. 1986. Heterokaryon incompatibility in *Aspergillus flavus*. Mycologia, Vol. 78: 98-101.
17. Puhalla, J. E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. Canadian Journal of Botany, Vol. 63: 179-183.
18. Yamasaki, Y. & H. Niizeki. 1965. Studies on variation of the rice blast fungus *Pyricularia oryzae* Cav. I. Karyological and genetical studies on variation. Bulletin of National Institute of Agriculture Science (Japan), Vol. 13: 231-273.
19. Zeigler, R. S., R. P. Scott, H. Leung, A. A. Bordeos, J. Kumar & R. J. Nelson. 1997. Evidence of the parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. Phytopathology, Vol. 87: 284-294.

Characterization of Vegetative Compatibility Groups in *Magnaporthe grisea* Poulation in Guilan Province, Iran

S. MOUSANEJAD[1], M. JAVAN NIKKHAH[2] AND E. MOHAMMADI GOLTAPE[3]

1, Researcher, Rice Research Instititute, 2, Assistant Professor, University College of Agriculture & Natural Resources (UCAN), University of Tehran, Karaj, Iran 3, Scientific Member, Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modarres

Accepted. April. 28, 2004

SUMMARY

A total of one hundred and seventeen isolates of *Magnaporthe grisea* , the causal fungus of rice blast, including fifty three isolates from different regions of Guilan province and sixty four isolates collected from experimental field of Rice Research Institute of Iran (RRII) in Rasht have been studied for evaluation of genetic diversity of fungus based on determination of vegetative compatibility groups (VCGs). VCGs among these populations were studied through isolating nitrate non-utilizing mutants in each isolate. The results reveald that *M. grisea* population can be divided into three VCGs, designated as VCG1, VCG2 and VCG3. VCG2 was the most common group in these areas, while VCG1 and VCG3 were the second and third most prevalent VCGs. Among isolates from different regions of Guilan, 42.30%, 55.76% and 1.92% of isolates belonged to VCG1, VCG2 and VCG3, respectively. Also, 34.37%, 60.93% and 4.68% of isolates from experimental field of RRII belonged to VCG1, VCG2 and VCG3, respectively. Totally, 37.93%, 58.62% and 3.44% of the total isolates of the two populations were grouped into VCG1, VCG2 and VCG3, respectively. Isolates of VCG1 and VCG2 were collected from cultivars Binam, Taroom-Molai and Hashemi. Most of the isolates from cultivars Khazar and Hasani belonged to VCG2. This investigation revealed the fact that the fungus population shows low genetic diversity. Moreover, characterization of vegetative compatibility groups is a useful method for evaluation of genetic diversity in *M. grisea* populations.

Key words: Rice, blast disease, *Magnaporthe*, VCG, Heterokarion.