Iranian Journal of Plant Protection Science
Vol 47, No 2, Autumn & Winter 2017 (241-252)
DOI: 10.22059/ijpps.2017.141798.1006688

دانش گیاهپزشکی ایران
دورۀ ۴۷، شمارۀ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵ (ص ۲۵۲-۲۴۱)

ارزیابی مفهوم گونۀ بیولوژیکی در برخی گونه‌های جنس *Armillaria* در ایران

سعیده جعفرپور[۱]، خلیل بردی فتوحی فر[۲*]، محمد جوان نیک‌خواه[۳] و محمدرضا آصف[٤]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری قارچ‌شناسی، دانشیار و استاد، بخش بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدۀ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، کرج
٤. استادیار بخش تحقیقات رستنی‌ها، مؤسسۀ تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۱/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۲)

چکیده

در طی ماه‌های شهریور تا آذر سال‌های ۱۳۸۹ الی ۱۳۹۱، شمار هفده بازیدیوکارپ از قارچ *Armillaria* از مناطق مختلف جنگلی واقع در استان‌های گیلان، مازندران و گلستان گردآوری و از آن‌ها ۲٤ جدایۀ قارچی به دست آمد. سپس آزمون سازگاری جنسی با استفاده از ده جدایۀ منتخب با دوازده جدایۀ آزمایشگر از سه گونۀ اروپایی *A. mellea*، *A. gallica* و *A. cepistipes* انجام گرفت. آزمون تلاقی همچنین برای تشخیص معیارهای جداسازی درون‌گونه‌ای نیز استفاده شد. آزمون سازگاری جنسی در ۳٦۰ تلاقی بین‌گونه‌ای، جدایه‌ها را در دو گروه *A. mellea* و *A. gallica* قرار داد. در ۱۲٦ تلاقی درون‌گونه‌ای واکنش‌های سازگار و یا نیمه سازگار شناسایی شدند. تجزیه‌وتحلیل تلاقی‌ها، جداسازی آشکاری از فراوانی پیوند ریسه‌ای یا هیفی (MFF) و فراوانی تشکیل خطوط تیره (BLF) و همچنین تغییر ریخت‌شناختی (مورفولوژی) پرگنه را نشان داد. همچنین آزمون تلاقی جنسی سه گونه *A. mellea*، *A. gallica* و *A. cepistipes* را به خوبی از هم جداسازی کرد و سازگاری جنسی گونه‌های ایرانی را با همتای اروپایی‌شان نشان داد. گونۀ *A. gallica* به‌دست‌آمده از ایران به‌رغم ارتباط تبارزایی (فیلوژنتیکی) نزدیک با گونۀ *A. cepistipes*، از نظر باروری به‌کلی مجزا بود. نتایج این تحقیق مشخص می‌کند که استفاده از مفهوم گونۀ بیولوژیکی در این قارچ شامل بررسی‌های سازگاری جنسی و رویشی است که با انتخاب الگوی درست از جدایه‌ها می‌تواند همچنان استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: آگاریکالس، سازگاری جنسی، سازگاری رویشی، قارچ، مورفولوژی پرگنه.

Investigation of biological species concept in some *Armillaria* species in Iran

Saeideh Jafarpour[1], Khalil-Berdi Fotouhifar[1*], Mohammad Javan-Nik Khah[1] and Mohhamad Reza Asef[2]
1, 2, 3. Ph. D. Candidate, Associate Professr and Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4. Assistant Professor, Department of Botany, Iranian Plant Protection Research Institute, Tehran, Iran
(Received: Feb. 8, 2016 - Accepted: Nov. 22, 2016)

ABSTRACT

During September to November 2010-2012, 17 fruiting body specimens of *Armillaria* were collected from diverse forest sites in Guilan, Mazandaran and Golestan Provinces (Iran) and 24 basidiocarp derived isolates were obtained. Mating tests were performed using 10 Iranian representative isolates and 12 European tester strains of European species including *A. mellea*, *A. gallica* and *A. cepistipes*. Crossing tests were also used for identification of interspecific and intraspecific separation criteria. In the mating test of a total number of 360 interspecific crosses, Iranian isolates were divided into two *A. mellea* and *A. gallica* groups. Hemi-compatible and compatible reactions were found in 126 interspecific crosses. Analysis of crosses demonstrated clear separation for both MFF (mycelial fusion frequency) and BLF (black line frequency) and also change in culture morphology. Mating data clearly distinguished three species including *A. mellea*, *A. gallica* and *A. cepistipes* and defined sexual compatibility of Iranian species with their European counterparts. In spite of close phylogenetic relationship between Iranian *A. gallica* and *A. cepistipes*, it also represented a significant clear cut based on the sexual fertility. The results suggest that biological species concept in these fungi consist of using both somatic and sexual compatibilities that still can be used in case of selection of a proper pattern of isolates.

Keywords: Agaricales, culture morphology, fungus, sexual compatibility, somatic compatibility.

* Corresponding author E-mail: fotowhi@ut.ac.i Tel: +98 26 32224022-4

مقدمه

جنس *Armillaria* (Fr.:Fr) Staude در میان بازیدیوسیت‌های عالی در چندین مورد مستثنا است. اعضای این جنس مرحلهٔ رویشی دیپلوئید دارند و نماریشه (رایزومورف)های متنوع در این جنس به‌صورت گروه‌های رویشی بزرگ در نظر گرفته می‌شوند که می‌توانند صدها تا هزاران سال دوام داشته باشند (Smith *et al*., 1992; Ferguson *et al*., 2003). دو نوع چرخهٔ زندگی دیپلوئید و یا دیپلوئید-دیکاریوتیک در این جنس مشاهده می‌شود. این جنس انتشار جغرافیایی و دامنهٔ میزبانی گسترده‌ای داشته و از نظر اقتصادی اهمیت زیادی دارد. افزون بر اهمیت اقتصادی به لحاظ بیماری‌زایی، برخی گونه‌های این جنس مانند *A. gallica* ویژگی پودرستی (ساپروفیتی) داشته و از تجزیه‌کنندگان چوب در جنگل به شمار می‌آیند (Fox, 2000). گونهٔ *A. mellea* به‌عنوان عامل اصلی زوال درختان بلوط در جنگل حاتم بیگ در استان اردبیل معرفی شده است (Davari & Askari, 2005).

تاکنون تشخیص گونه‌های بیولوژیک با استفاده از آزمون‌های آمیزشی به‌عنوان یک ابزار سودمند در آرایه‌بندی (تاکسونومی) این قارچ استفاده شده است. نخستین بار هینتیکا (Hintikka, 1973) تفاوت ماکرومورفولوژیکی پرگنه‌های به‌دست‌آمده از تک اسپورها و بافت قارچی را مشاهده کرد. بنابر این مشاهده‌ها کشت‌های تک اسپوری، میسلیوم‌های هوایی سفید تا کرم‌رنگ ایجاد می‌کنند درحالی‌که جدایه‌های به‌دست‌آمده از کشت‌های بافت قارچی فشرده، صاف و بدون میسلیوم‌های هوایی هستند و به‌طورمعمول به رنگ قهوه‌ای تیره دیده می‌شوند. وی همچنین نشان داد که در تلاقی‌های سازگار جنسی ریخت‌شناختی یا ظاهر (مورفولوژی) پرگنه برابر با نظام آمیزشی چهار قطبی تغییر می‌کند. بنابر این نظام، میسلیوم‌های هاپلوئید دو آلل A و B دارند و پس از تماس دو میسلیوم و پیوند هیفه‌ای[1] (آناستوموز هیفی)، یکی از چهار حالت زیر ممکن است رخ دهد:

۱) واکنش ناسازگار (incompatible)، که در این نوع واکنش دو شریک قارچی در کنار هم رشد می‌کنند و هیچ‌گونه درهم‌آمیختگی ریسه‌ها و پیوند ریسه‌ای و همچنین تغییر در ظاهر پرگنه‌ها صورت نمی‌گیرد. این واکنش در نتیجهٔ برهمکنش آلل‌ها با آلل A1B1 x A1B1 صورت می‌گیرد. ۲) واکنش سازگار (compatible)، در این نوع واکنش پیوند ریسه‌ای صورت می‌گیرد و منجر به تشکیل پرگنهٔ یکنواخت می‌شود. ظاهر پرگنه از پنبه‌ای (fluffy) به صاف و چرمی (crustose) تغییر می‌کند. مهاجرت هسته‌ها و دیپلوئید شدن فرآیند به‌نسبت آرامی را طی می‌کند. این واکنش در نتیجهٔ برهمکنش آلل‌هایآلل A1B1 x A2B2 ایجاد می‌شود. ۳) واکنش نیمه سازگار (a-common hemi compatible)، در نتیجه ترکیب آلل‌هایآلل A1B1 x A1B2 صورت می‌گیرد. ۴) واکنش نیمه سازگار (b-common hemi compatible)، در نتیجه ترکیب آلل‌هایآلل A1B1 x A2B1 انجام می‌شود. در حالت‌های ۳ و ۴، واکنش همانند ناسازگاری است. با این تفاوت که در واکنش ناسازگار به‌طورمعمول یک ناحیهٔ بازدارنده بین دو جدایه تشکیل می‌شود. این ناحیه به‌طورمعمول بدون میسلیوم‌های هوایی بوده و یا میسلیوم‌ها به‌صورت پراکنده دیده می‌شوند (Shaw & Klie, 1991).

با استفاده از آزمون سازگاری جنسی، تاکنون هفت گونهٔ بیولوژیک در اروپا (Korhonen, 1978)، پنج گونه در آمریکای شمالی (Anderson & Ulltrich, 1979). شش گونه در استرالیا (Kile *et al*., 1989)، ده گونه در ژاپن (Ota *et al*., 1998) و سیزده گونه در چین (Qin *et al*., 2007) شناسایی شده است. در تحقیق به‌عمل‌آمده در کانادا و در شمال اُنتاریو نیز چهار گونهٔ بیولوژیک شناسایی شده است (Dumas, 1998). همچنین این مفهوم برای شناسایی هفت گونه از جمله گونهٔ نامشخص "Nag E" در شمال ژاپن استفاده شد (Ota *et al*., 2009). بر پایهٔ تنها تحقیق به‌عمل‌آمده در ایران (Asef *et al*., 2003)، شش گونهٔ بیولوژیک: *A. mellea*، *A. borealis*، *A. cepistipes* و *A. gallica* و دو گونهٔ بدون نام، شناسایی شده است. در این تحقیق گونه‌های *A. mellea* و *A. gallica*

1. Mycelial Fusion Frequency

بیشترین فراوانی را از نظر جدایه‌های مورد بررسی نشان دادند.

در نخستین تحقیقات به‌عمل‌آمده (Korhonern, 1978; Anderson & Ullrich, 1979) گونه‌های بیولوژیک اروپایی و آمریکای شمالی نابارور تشخیص داده شدند. ولی در پی آن درجه‌های کمی از سازگاری جنسی میان گونه‌های مختلف بین‌قاره‌ای ملاحظه شد، به‌طوری‌که سازگاری نداشتن کامل بین *NABS X* و *A. cepistipes* اروپا مشاهده شد. لیکن همچنان وجود سازگاری بین گونهٔ *A. cepistipes* اروپا و *NABS XI* مشاهده شده است (Morison *et al*., 1985). در تحقیق دیگری نیز بر پایهٔ یک نمونه‌برداری جدید از شبه جزیرهٔ المپیک (Olympic Peninsula) در آمریکا میزان ۶۰درصد سازگاری جنسی بین گونهٔ *A. cepistipes* اروپا با *NABS XI* گزارش شده است (Banik *et al*., 1996). در پی آن در بررسی ارتباط گونه‌های *NABS XI, NABS X, A. sinapina* آمریکای شمالی و *A. cepistipes* اروپا با مشاهدهٔ یک نوار (باند) مشترک RFLP در برش rDNA، همچنین سازگاری جنسی معادل ۵۷درصد بین گونهٔ *A. cepistipes* اروپا با *NABS XI* این دو گونهٔ متجانس در نظر گرفته شدند. این سازگاری نسبی توسط محققان دیگر نیز مشاهده شده است (Berubee *et al*., 1998). درحالی‌که به علت سازگاری جنسی کم بین گونه‌های NABS X و *A. sinapina* با گونهٔ اروپایی *A. cepistipes* این گونه‌ها جدا از دیگر و *NABS X* به‌عنوان گونهٔ جدید مدنظر قرار گرفتند (Banik *et al*., 1998).

در آغاز اعضای جنس *Armillaria* در نیم‌کرهٔ شمالی بر پایهٔ ویژگی‌های ظاهری یا ریخت‌شناختی و بوم‌شناختی (اکولوژیکی) به چهار گروه تقسیم شد و گونهٔ *A. mellea* همچنین گونهٔ بدون حلقهٔ *A. tabescence* به‌عنوان یک خوشهٔ (کلاستر) جداگانه در نظر گرفته شدند (Korhonen, 1995). بر این پایهٔ در خوشهٔ سوم گونه‌های *A. ostoyae*، *A. gemina* و *A. borealis* و در خوشهٔ چهارم گونه‌های *A. gallica*، *A. cepistipes*، *A. sinapina*، *A. calvescence*، *NABS X* و *NABS XI* قرار گرفتند. خوشهٔ یادشده به نام خوشهٔ *gallica* معرفی شد. درحالی‌که مفهوم آرایه‌بندی خوشهٔ چهارم هنوز مبهم به نظر می‌رسد (Korhonen, 1995).

از سویی گونه‌های *A. cepistipes* و *A. gallica* اروپایی به لحاظ ظاهری بسیار به هم نزدیک هستند و در تحقیقات تبارزایی (فیلوژنتیکی) در سال‌های اخیر، به لحاظ توالی ناحیهٔ ITS غیر قابل‌تشخیص در نظر گرفته شدند. اگرچه کاربرد روش‌های جدید مولکولی مانند استفاده از توالی ژن عامل بسط آلفا (EF-1α) تنوع شایان ملاحظه‌ای را بین این دو گونه نشان داده است، ولی همچنان این دو گونه با ارتباط نزدیک تبارزایی نسبت به دیگر گونه‌ها در نظر گرفته می‌شوند و در یک بالاکلاد (Gallica) جای می‌گیرند (Anthonin *et al*., 2009; Hasegawa *et al*., 2010). در تحقیق به‌عمل‌آمده در آمریکای شمالی نیز گونه‌های بیولوژیک شناسایی شده با استفاده از نشانگر AFLP و همچنین توالی ژن‌های ریبوزومی تأیید شده‌اند (Kim *et al*., 2006). امروز گونه‌های بیولوژیک شناسایی شده در چین با استفاده از تجزیه‌های تبارزایی بررسی شده و گونه‌های نامشخص در خوشهٔ *A. gallica* جای گرفتند (Coetzee *et al*., 2015).

اگرچه *Armillaria* به فراوانی در ایران وجود دارد، ولی اطلاعات آرایه‌بندی اندکی در مورد این قارچ در ایران در دسترس است. به‌جز یک موردتحقیق انجام‌شده توسط Asef *et al*. (2003)، که طی آن چهار گونه شامل *A. cepistipes*، *A. borealis*، *A. mellea* و *A. gallic* از ایران شناسایی شده است، هیچ بررسی دیگری در زمینهٔ شناسایی گونه‌های بیولوژیک این جنس در ایران صورت نگرفته است. ازآنجاکه بررسی گونهٔ بیولوژیک، قابلیت باروری و امکان تبادل‌های ژنتیکی بین گونه‌ها در شناخت بهتر ظرفیت و قابلیت تکاملی بیمارگرها ضروری به‌نظر می‌رسد، همچنین با توجه به درهم‌ریختگی آرایه‌بندی گونه‌های *Armillaria* در سال‌های اخیر، این تحقیق با هدف بررسی نحوهٔ کاربرد و قابلیت مفهوم گونهٔ بیولوژیک برای تعیین حدود و دامنهٔ گونه‌های *Armillaria* ایرانی و همچنین بررسی ارتباط بیولوژیک گونه‌های اروپایی *A. mellea*، *A. gallica* و *A. cepistipes* با جدایه‌های منتخب ایرانی، برای کمک به رفع ابهام در تعامل‌های گونه‌های نزدیک به هم در خوشهٔ *A. gallica* صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جدایه‌های قارچی

در ماه‌های سال‌های ۱۳۸۹ الی ۱۳۹۱ از شش پایگاه جنگلی واقع در سه استان شمالی ایران شامل گیلان (شفارود)، مازندران (نور و بهشهر) و گلستان (کردکوی، علی‌آباد و آب‌بندان) بازدیدهایی انجام شد و از اندام‌های باردهی قارچ *Armillaria* نمونه‌برداری صورت گرفت. در آغاز پارسل‌های آلوده با گردش در جنگل شناسایی شدند و در هر پایگاه جنگلی یک پارسل‌های آلوده انتخاب شد و به‌طور تصادفی از بازیدیوکارپ‌های تشکیل‌شده روی چوب نمونه‌برداری شد. اسپور پرینت قارچ از کلاهک‌های تازه روی کاغذ تهیه شد. سپس بازیدیوکارپ‌ها در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس خشک شدند. اسپورهای یک اسپور پرینت و یا قطعه‌های کوچکی از فلس به ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد و سپس غلظت‌های مختلف دروایهٔ (سوسپانسیون) اسپور شامل غلظت اصلی و رقت یک به پنج روی محیط مالت آگار ۲درصد (حاوی عصارهٔ مالت ۲درصد، آگار ۱/۵درصد، بنومیل ۱۶درصد و ۱۰۰ میلی‌گرم سولفات استرپتومایسین) پخش شدند. تشتک‌های پتری حاصل در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. بازیدیوسپورهای جوانه‌زده (بین ۷-۳ روز) در زیر میکروسکوپ نوری جدا شده و به محیط مالت آگار جدید منتقل شدند. جدایه‌های منتخب به‌دست‌آمده درون لوله‌های درپوشدار ۱۰ میلی‌لیتر حاوی محیط کشت مالت آگار (حاوی ۷۵درصد عصارهٔ مالت، ۷۵درصد دکستروز، ۰/۵درصد پپتون و ۱/۵درصد آگار) منتقل شدند (Worall, 1991) و پس از رشد در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند.

آزمون سازگاری جنسی

در این تحقیق از میان جدایه‌های قارچی به‌دست‌آمده، ده جدایهٔ منتخب از مناطق جغرافیایی مختلف در ایران به‌عنوان نماینده استفاده شدند. جدایه‌ها بر پایهٔ فاصلهٔ جغرافیایی انتخاب شده‌اند. شش جدایه از فاصله‌های جغرافیایی دور به‌عنوان نماینده از شش پایگاه جداگانه شامل شفارود، علی‌آباد، نور، کردکوی، آب‌بندان و بهشهر و چهار جدایه از یک پارسل واقع در یک پایگاه (نور) از فاصلهٔ جغرافیایی نزدیک انتخاب شده‌اند (جدول ۱). ۱۲ جدایه‌های آزمایشگر اروپایی از مؤسسهٔ تحقیقات منابع طبیعی فنلاند و دانشکدهٔ جنگل‌شناسی دانشگاه بلگراد، صربستان دریافت شدند. از هر سه گونهٔ *A. gallica*، *A. cepistipes* و *A. mellea* چهار جدایه برای انجام تلاقی استفاده شدند. منشأ جدایه‌های آزمایشگر، کشورهای ایتالیا، روسیه و پرتغال بودند (جدول ۱).

جدول ۱. جدایه‌های مورد استفاده در آزمون سازگاری جنسی

Table 1. Isolates of *Armillaria* used in mating tests

Isolate	Locality	Host	Species	Reference
P4	Iran- Guilan-Shafarood	*Cerpinus betulus*	*Armillaria* sp.	
M6	Iran- Golestan-Aliabad	*Alnus* sp.	*Armillaria* sp.	
V1	Iran-Mazandaran-Nour	Dead wood	*Armillaria* sp.	
R1	Iran – Golestan- Kordkuy	*Pierocarya fraxinifolia*	*Armillaria* sp.	
N1	Iran- Golestan-Abbandan	*Coprinus betulus*	*Armillaria* sp.	
H10-9	Iran- Mzandaran-Behshahr	*Parrotia persica*	*Armillaria* sp.	
V2-9-2	Iran-Mazandaran-Nour	*Fagus orientalis*	*Armillaria* sp.	
V2-3	Iran-Mazandaran-Nour	Dead wood	*Armillaria* sp.	
V4	Iran-Mazandaran-Nour	Dead wood	*Armillaria* sp.	
V5	Iran-Mazandaran-Nour	Dead wood	*Armillaria* sp.	
KK030761/1	Italy-Trentino, Giovo	*Pinus sylvestris*	*Armillaria mellea*.	Korhonen (1978)
KK032777	Italy,Trentino, Maso Omeri	*Corylus* sp.	*Armillaria mellea*	Korhonen (1978)
KN97081/1	Maderia-Portugal	*Pinus* sp.	*Armillaria mellea*	Korhonen (1978)
KK03196/1	Italy-Trentino, Terme Di Comano	*Pinus sylvestris*	*Armillaria mellea*	Korhonen (1978)
KN10028/1	Moscow, Bot. Garden GBS	*Quercus* sp.	*Armillaria mellea*	Korhonen (1978)
KK03045/2	Italy,Trentino, Tenno	*Picea abies*	*Armillaria gallica*	Korhonen (1978)
KK07008/2	Russia,Voronezh, Tellerman Forest	Unknown	*Armillaria gallica*	Korhonen (1978)
KK05297/1	Russia, Mordovia, Sarnask	Unknown	*Armillaria gallica*	Korhonen (1978)
KK10024/1	Russia, Moscow, "Loc.vyii Ostorv"	Unknown	*Armillaria cepistipes*	Korhonen (1978)
KK09043/2	Russia, Siberia, Krasnoyark	Unknown	*Armillaria cepistipes*	Korhonen (1978)
KK09043/5	Russia, Siberia, Krasnoyark	Unknown	*Armillaria cepistipes*	Korhonen (1978)
KN03089/2	Italy, Veneto,Monte Grappa	*Fagus Silvatica*	*Armillaria cepistipes*	Korhonen (1978)

در مجموع ۲۲ جدایه در این آزمایش استفاده شدند که شامل دوازده جدایهٔ آزمایشگر از گونه‌های *A. mellea*، *A.gallica*، *A. cepistipes* و ده جدایهٔ تک اسپور ایرانی بود. جدایه‌های ایرانی بر پایهٔ سازگاری جنسی با تغییر یا تغییر نکردن ظاهر پرگنه و سازگاری رویشی با بررسی وجود خطوط تیره[1] در ناحیهٔ تماس و در تعامل با جدایه‌های اروپایی شناسایی شدند. ده جدایهٔ ایرانی با گونهٔ نامشخص در این آزمایش در آغاز در سه تکرار با دوازده جدایهٔ آزمایشگر (از هر سه گونه آزمایشگر شامل گونه‌های *A. mellea*، *A. gallica* و *A. cepistipes*) چهار جدایه تلاقی شدند. پس از گروه‌بندی و ثبت نوع واکنش‌ها و تشخیص گونه، جدایه‌های گروه‌های به‌دست‌آمده تلاقی‌های درون‌گونه‌ای نیز شدند. آزمایش تلاقی‌ها در محیط مالت آگار ۱درصد صورت گرفت. برحسب سرعت رشد هر جدایهٔ پرگنه‌های جوان ۱۰-۷ روزه برای انجام آزمون تلاقی استفاده شدند. قرص‌های میسیلومی به ابعاد ۵ میلی‌متر از حاشیهٔ جوان پرگنه هر جدایه درون تشتک‌های پتری ۱۰ سانتی‌متری در دو تکرار در فاصله‌های متفاوت ۵ و ۱۰ میلی‌متر از هم دیگر قرار گرفتند. الگوی مورد نظر به علت امکان تفاوت در سرعت رشد جدایه‌های مختلف و به‌منظور ایجاد زمان کافی برای بررسی واکنش‌ها در تلاقی‌های انجام شده انتخاب شد. تلاقی‌ها در سه تکرار و در سه تشتک پتری جداگانه صورت گرفت. تشتک‌های پتری حاوی تلاقی‌ها در دمای ۲۳ درجهٔ سلسیوس در شرایط تاریکی مداوم نگهداری شده و تعامل بین جدایه‌ها به‌طور متناوب بررسی و نمره‌دهی واکنش‌ها در دو فاصلهٔ زمانی سه و پنج هفته پس از کشت انجام شد. این زمان بر پایهٔ روش استاندارد در انجام آزمون سازگاری جنسی در نظر گرفته شده و زودتر و یا دیرتر از این زمان واکنش‌ها قابل ارزیابی دقیق نیستند (Qin *et al*., 2007).

1. Black Line Frequency

نتایج

نمونه‌برداری و جدایه‌های قارچی

در این تحقیق ۲۴ جدایهٔ تک اسپوری از شش پایگاه جنگلی واقع در بخشی از جنگل‌های شمال غرب (جنگل شفارود) تا شمال شرق جنگل علی‌آباد (طرح سرخداری) و از میزبان‌های مختلف پهن‌برگ مانند راش، افرا، ممرز، توسکا و لرگ به دست آمدند. در بین این جدایه‌ها آن‌هایی که پرگنهٔ سفیدرنگ و پنبه‌ای داشتند که با گذشت زمان و پیش از انجام تلاقی هیچ‌گونه تغییری در ظاهر پرگنه نشان ندادند و به‌عنوان پرگنه‌های هاپلوئید با اطمینان در آزمون سازگاری جنسی قابل استفاده بودند، انتخاب شدند. این انتخاب همچنین بر پایهٔ فاصلهٔ جغرافیایی پایگاه‌های مختلف جنگلی صورت گرفت. به‌طوری‌که از هر پایگاه جنگلی یک نماینده انتخاب شد. همچنین از یک پایگاه، چهار جدایه مربوط به یک پارسل انتخاب شدند و در مجموع برای انجام تلاقی‌های آمیزشی ده جدایهٔ نماینده استفاده شدند.

آزمون سازگاری جنسی

بررسی سازگاری و ناسازگاری جدایه‌های شرکت‌کننده در واکنش بر پایهٔ ظهور خط تیره‌رنگ در ناحیهٔ تماس، نبود ناحیهٔ جداگانه در محل تماس دو پرگنه و همچنین تغییر ظاهر پرگنه از سفید پنبه‌ای به چرمی و کاهش و یا حذف میسلیوم‌های هوایی در محل تماس دو پرگنه همراه با تغییر رنگ آشکار پرگنه در نمای رویی و پشتی تشتک پتری صورت گرفت. جدایه‌های مورد بررسی بر پایهٔ سازگاری رویشی و جنسی گروه‌بندی شدند.

از میان ۴۲۳ تلاقی بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای، ۴۰۸ تلاقی قابل ارزیابی بودند. دیگر تلاقی‌ها به علت رشد نکردن پرگنه و یا واکنش نامشخص قابل ارزیابی نبودند. در مجموع ۶۹ تلاقی با جدایه‌های منتخب ایرانی شامل P4، M6، R1، V1 و H10-9 با جدایه‌های آزمایشگر اروپایی گونهٔ *A. mellea*، واکنش مثبت (+) و سازگار جنسی تشخیص داده شد. در سه تلاقی مربوط به جدایهٔ H10-9 با جدایهٔ آزمایشگر اروپایی

KK030761، واکنش نیمه سازگار مشاهده شد. درحالی‌که در مورد جدایه‌های این گروه، در مجموع ۱۴۴ تلاقی با جدایه‌های آزمایشگر *A. gallica* و *A. cepistipes* واکنش منفی (-) و ظهور ناسازگاری میسیلیومی دو تا سه هفته پس از تلاقی همراه با تشکیل خطوط تیرهٔ قوی در محل تماس دو پرگنه در هر دو نمای رویی و پشتی پرگنه، شایان ملاحظه بود. این تلاقی‌ها جدایه‌های مورد نظر که شامل شش جدایهٔ یادشدهٔ بالا بود را در گروه *A. mellea* قرار دادند (جدول ۲).

جدول ۲. تلاقی‌های جدایه‌های ایرانی و جدایه‌های آزمایشگر اروپایی

Table 2. Mating tests between Iranian isolates and European tester strains

	A. mellea				*A. gallica*				*A. cepistipes*			
Isolate	KK030761	KK032777	KN97081	KK03196/1	KN10028/1	KK030452	KK07008/2	KK052971	KK10024/1	KK09043/2	KK09043/5	KN03089/2
P4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
V1	+	+	+	+	-	-	-		-	-	-	-
V1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
V1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
R1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
R1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
R1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
H10-9	+	+	+	H	-	-	-	-	-	-	-	-
H10-9	+	+	+	H	-	-	-	-	-	-	-	-
H10-9	+	+	+	H	-	-	-	-	-	-	-	-
N1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
N1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
N1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
V2-92	-	-	-	-	+	+	+	+	*	*	*	*
V2-92	-	-	-	-	+	+	+	+	*	*	*	*
V2-92	-	-	-	-	+	+	+	+	*	*	*	*
v2-3	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
v2-3	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
v2-3	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
v4	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
v4	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
v4	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
v5	-	-	?	-	+	+	+	+	-	-	-	-
v5	-	-	?	-	+	+	+	+	-	-	-	-
v5	-	-	?	-	+	+	+	+	-	-	-	-

(+): سازگار، (ـ): ناسازگار، (*): رشد نکرده، (؟): مبهم، (H): نیمه سازگار

Compatible, (-) Incompatible, (*) No growth, (?) Ambiguous, (H) Hemi-compatible (+)

در گروه دوم، در ۴۸ تلاقی صورت گرفته بین جدایه‌های منتخب شامل جدایه‌های V2-92، V2-3، V4 و V5با جدایه‌های آزمایشگر *A. gallica* واکنش مثبت (+) سازگار جنسی نشان داده شد. درحالی‌که در تعامل این جدایه‌ها با جدایه‌های آزمایشگر دو گروه *A. cepistipes* و *A. mellea* واکنش منفی (-) قابل ارزیابی بود. جدایه‌های این گروه از ۹۶ تلاقی با جدایه‌های آزمایشگر گونه‌های *A. cepistipes* و *A. mellea*، ۸۱ تلاقی ناسازگار میسلیومی با تشکیل خطوط تیرهٔ قوی دو تا سه هفته پس از تلاقی نشان دادند که به‌طور آشکار در نمای رویی و پشتی پتری قابل‌مشاهده بود. این تلاقی‌ها مربوط به چهار جدایه بوده که به‌عنوان گونهٔ *A. gallica* تشخیص داده شدند. واکنش جدایهٔ V5 با جدایهٔ آزمایشگر (KN97081) *A. mellea* به علت آشکار نبودن در ناحیهٔ تماس دو پرگنه، مبهم ارزیابی شد و در تلاقی جدایهٔ V2-92 با جدایه‌های آزمایشگر *A. cepistipes* به علت رشد نکردن پر گنه واکنش قابل ارزیابی نبود (جدول ۲).

در واکنش‌های درون‌گونه‌ای *A. mellea*، جدایه‌هایی که در جدول یک به‌عنوان گونهٔ *A. mellea* تشخیص داده شدند به‌غیراز خود، با دیگر جدایه‌های هم‌گروه تلاقی داده شدند. از ۴۵ تلاقی صورت گرفته، واکنش سازگاری جنسی (+) در ۴۲ مورد و واکنش نیمه سازگاری (H) در سه مورد در ترکیب جدایه‌های

R1-N1 مشاهده شد (جدول ۳). نه تلاقی درجاتی از خطوط تیره با فراوانی پایین در محل تماس دو پرگنه ایجاد کردند، ولی در نهایت واکنش سازگار جنسی در ترکیب این جدایه‌ها نیز ملاحظه شد.

در بررسی واکنش‌های درون‌گونه‌ای *A. gallica* جدایه‌هایی که در جدول ۱ با عنوان *A. gallica* مشخص شدند نیز به‌غیراز خود، با دیگر جدایه‌های هم‌گروه تلاقی داده شده و نتایج به‌صورت واکنش‌های سازگار و یا نیمه سازگار قابل ارزیابی بود. از هجده تلاقی درون‌گونه‌ای جدایه‌های *A. gallica*، دوازده تلاقی واکنش نیمه سازگار و شش تلاقی واکنش سازگار ایجاد کردند (جدول ۴).

جدول ۳. تلاقی‌های درون‌گونه‌ای در گونهٔ *A. mellea*

Table 2. Intraspecific pairing within *A. mellea* species

Isolate	P4	M6	V1	R1	H10-9	N1
P4	/	+	+	+	+	+
P4	/	+	+	+	+	+
P4	/	+	+	+	+	+
M6	+	/	+	+	+	+
M6	+	/	+	+	+	+
M6	+	/	+	+	+	+
V1	+	/	/	+	+	+
V1	+	+	/	+	+	+
V1	+	+	/	+	+	+
R1	+	+	+	/	+	H
R1	+	+	+	/	+	H
R1	+	+	+	/	+	H
H10-9	+	+	+	+	/	+
H10-9	+	+	+	+	/	+
H10-9	+	+	+	+	/	+
N1	+	+	+	H	+	/
N1	+	+	+	H	+	/
N1	+	+	+	H	+	/

(+): سازگار، (–): ناسازگار، (/): تلاقی انجام نشده، (H): نیمه سازگار

(+) compatible, (-) incompatible, (/) pairing was not carried out, (H) hemicompatible

جدول ۴. تلاقی‌های درون‌گونه‌ای در گونهٔ *A. gallica*

Table 3. Intraspecific pairing within *A. gallica* species

Isolate	V2-92	V2-3	V4	V5
V2-92	/	H	H	H
V2-92	/	H	H	H
V2-92	/	H	H	H
V2-3	H	/	+	H
V2-3	H	/	+	H
V2-3	H	/	+	H
V4	H	+	/	+
V4	H	+	/	+
V4	H	+	/	+
V5	H	H	+	/
V5	H	H	+	/
V5	H	H	+	/

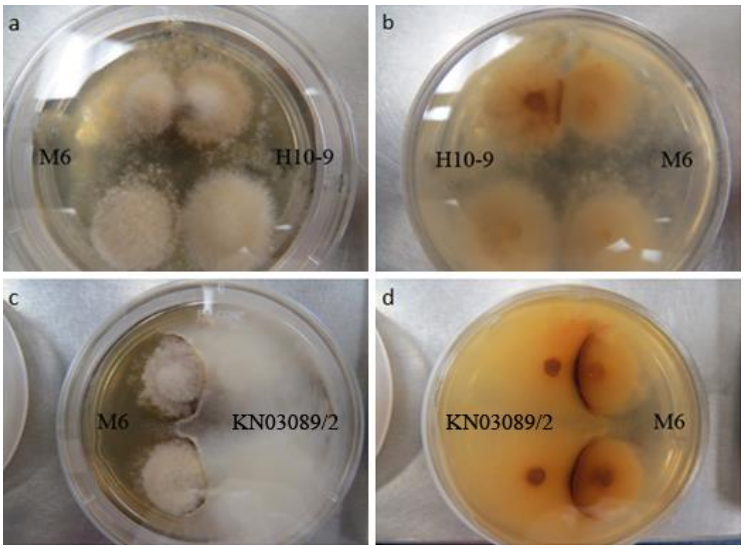
(+): سازگار، (–): ناسازگار، (/): تلاقی انجام نشده، (H): نیمه سازگار

(+) compatible, (-) incompatible, (/) pairing was not carried out, (H) hemicompatible

تشکیل خطوط تیره در واکنش‌های ناسازگار به‌طورمعمول سریع‌تر بوده و پس از دو سه هفته فراوان بود. درحالی‌که واکنش‌های سازگار جنسی به‌طورمعمول به‌آرامی صورت می‌گیرد و به‌طورمعمول پس از پنج هفته تکمیل و سپس تفسیر قابل انجام بود. در مقایسه تشکیل دو نوع خطوط تیره در واکنش سازگار و ناسازگار (شکل۱) مشخص شد که در واکنش ناسازگار خطوط تیره به‌صورت ضخیم و دیوار مانند به‌طوری‌که دو پرگنه را کامل از هم جداسازی می‌کند، تشکیل می‌شوند که درون آگار به‌خوبی نفوذ می‌کند. ولی خطوط تیره که در تلاقی‌های درون‌گونه‌ای و سازگار گاهی مشاهده می‌شود، خطوط کوچک، کوتاه، باریک و خطی بوده و هیچ‌گاه حالت دیوار مانند ایجاد نمی‌کند.

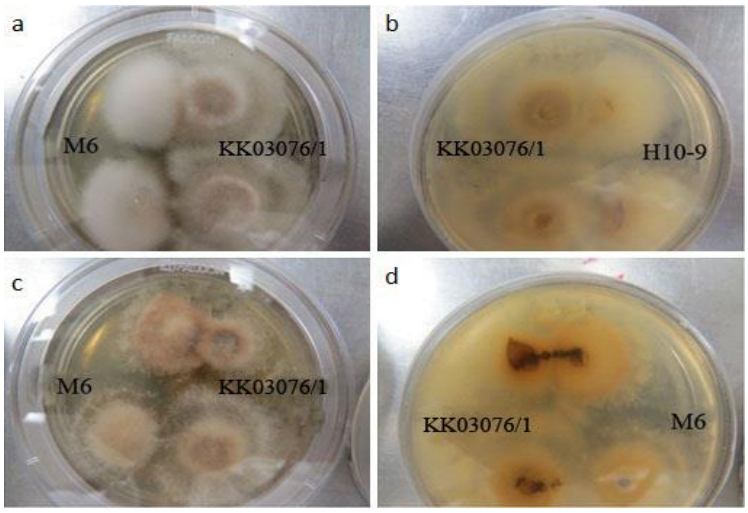
در واکنش‌های سازگار در نمای رویی (شکل ۲)،

ظاهر پرگنه‌ها به‌صورت چرمی درآمده و به‌ویژه در نمای پشتی، تغییر رنگ از سفید به قهوه‌ای تیره قابل‌ملاحظه است. درحالی‌که در واکنش‌های نیمه سازگار ظاهر پرگنه‌ها همچنان پنبه‌ای باقی‌مانده، ریسه‌ها کامل درهم‌آمیخته می‌شود و در نمای پشتی تشتک پتری نیز هیچ ناحیهٔ مشخص در محل تماس دو پرگنه و یا تغییر رنگی در پرگنه‌ها قابل مشاهده نیست (شکل ۲). همچنین مقایسه واکنش‌های سازگار در ترکیب جدایه‌های *A. gallica* با جدایهٔ آزمایشگر اروپایی و واکنش‌های ناسازگار در ترکیب همان جدایه‌ها با جدایهٔ آزمایشگر *A. mellea* و *A. cepistipes* بنابر توصیف یادشده در شکل ۳ قابل‌ملاحظه است.



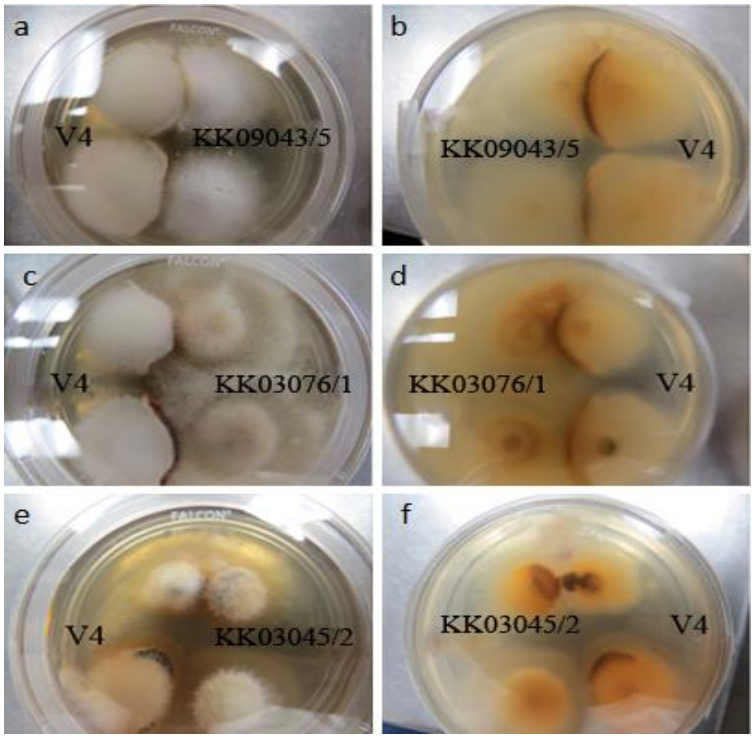
شکل ۱. واکنش‌های سازگار (درون‌گونه‌ای) و ناسازگار (بین‌گونه‌ای)؛ a و b. واکنش سازگار بین دو جدایه از گونهٔ *A. melle* (M6/H10-9) و c و d. واکنش ناسازگار بین جدایهٔ (M6) از گونهٔ *A. mellea* و جدایهٔ آزمایشگر KN03089/2 از گونه *A. cepistipes*.

Figure 1. Compatible (Intraspecific) and incompatible (Interspecific) reactions (a) and (b): compatible reaction between two *A. mellea* isolates (M6/H10-9), (c) and (d): incompatible reaction between M6 isolate (*A. mellea*) and *A. cepistipes* tester strain (KN03089/2).



شکل ۲. واکنش‌های نیمه سازگار و سازگار؛a و b. واکنش نیمه سازگار بین جدایهٔ (H10-9) از گونه *A. mellea* و جدایهٔ آزمایشگر KK03076/1 از گونهٔ *A. mellea*، c و d. واکنش سازگار بین جدایهٔ (M6) از گونه *A. mellea* و جدایهٔ آزمایشگر KK03076/1 از گونهٔ *A. mellea*.

Figure 2. Hemicompatible and compatible reactions: (a) and (b): hemicompatible reaction between *A. mellea* isolate (H10-9) and *A. mellea* tester strain (KK03076/1), (c) and (d): compatible reaction between *A. mellea* isolate (M6) and *A. mellea* tester strain (KK03076/1).



شکل ۳. واکنش‌های ناسازگار و سازگار؛ a و b. واکنش ناسازگار بین جدایهٔ (V4) و جدایهٔ آزمایشگر (KK03076/1) از گونهٔ *A. mellea*، c و d. واکنش ناسازگار بین جدایهٔ (V4) و جدایهٔ آزمایشگر (KK0943/5) از گونه *A.* cepistipes و e و f. واکنش سازگار بین جدایهٔ (V4) و جدایهٔ آزمایشگر (KK03045/2) از گونهٔ *A. gallica*.

Figure 3. Incompatible and compatible reactions: (a) and (b): incompatible reaction between isolate (V4) and *A. mellea* tester strain (KK03076/1), (c) and (d): incompatible reaction between isolate (V4) and *A. cepistipes* tester strain (KK0943/5) and e and f. compatible reaction between isolate (V4) and *A. gallica* tester strain (KK03045/2).

بحث

تجزیه‌وتحلیل تلاقی‌های هموکاریون- هموکاریون، جداسازی آشکاری بین فراوانی پیوند ریسه‌ای (mycelial fusion frequency =MFF) و فراوانی خطوط سیاه (black line frequency = BLF) در محل تماس دو پرگنه را نشان داد. تلاقی‌های درون‌گونه‌ای در بیشتر موارد نشان‌دهندهٔ پیوند ریسه‌ای (MFF) بودند. درحالی‌که در تلاقی‌های بین‌گونه‌ای هیچ‌گونه پیوند ریسه‌ای مشاهده نشد. تلاقی‌های بین‌گونه‌ای خطوط تیره با فراوانی زیاد (high BLF) را نشان دادند که به‌طور آشکار در سطح رویی و پشتی تشتک پتری قابل تشخیص بود. تنها شمار کمی از جدایه‌های *A. mellea* مانند تلاقی‌های P4/H10-9، M6/H10-9 و V1/M6 در تلاقی‌های خودی، خطوط تیره با فراوانی کم از خود نشان دادند. ولی وجود خطوط تیره در این تلاقی‌ها مانع پیشرفت سازگاری جنسی نبود. ظهور پیوند ریسه‌ای و یا تشکیل خطوط تیره در محل تماس دو پرگنه به ترتیب نشانگر وجود و یا نبود پذیرش ریسه‌ای (mycelial rejection) است، که از نظر زمانی زودتر از بروز واکنش جنسی و تولید میسلیوم‌های دیپلوئید صورت می‌گیرد. مفهوم اساسی در سازگاری میسلیومی دفع ریسه‌های غیرخودی و پیوند با ریسه‌های خودی است که با استفاده از پیوند ریسه‌ای صورت می‌گیرد و تبادل‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی را کنترل می‌کند. حتی کوچک‌ترین تغییر در آلل‌ها یا آلل کنترل‌کنندهٔ این فرآیند (*het* loci) می‌تواند منجر به بروز ناسازگاری شود. داده‌های ما دلیل آشکاری برای تأیید این دیدگاه ارائه می‌دهند که در تلاقی‌های هموکاریون- هموکاریون مراحل سازگاری سوماتیک در تلاقی‌های بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای از نظر زمانی زودتر از واکنش‌های سازگار جنسی و پدیدهٔ کاریوگامی صورت می‌گیرد. در واقع در تلاقی‌های بین‌گونه‌ای به علت ناهمگون (هتروژن) بودن ریسه‌ها

در محل تماس، پدیدهٔ تشخیص خودی از غیرخودی صورت گرفته و ریسه‌ها با ترشح مواد فنلی سبب مرگ یاخته‌ها در ناحیهٔ تماس شده و از بروز تبادل‌های ژنتیکی و پیشبرد فرآیند آمیزشی جلوگیری می‌کنند. بروز مرگ یاخته‌ای در ناحیهٔ تماس به‌صورت خطوط تیره قابل ملاحظه است (Worall, 1996). این پدیده در تلاقی‌های بین‌گونه‌ای با فراوانی بسیار زیادی صورت می‌گیرد. درحالی‌که به‌نظر می‌رسد در تلاقی‌های درون‌گونه‌ای مرگ یاخته صورت نگرفته و یا با فراوانی کمتری صورت می‌گیرد و منجر به پیشرفت نکردن فرآیند آمیزش جنسی نخواهد بود. در ارزیابی گونهٔ بیولوژیک امکان تبادل‌های ژنتیکی بین جدایه‌ها بایست مورد نظر قرار گیرد. این تبادل‌ها می‌تواند در برگیرندهٔ سازگاری میسلیومی و یا سازگاری جنسی باشد. ازآنجاکه تن‌آمیزی (سوماتوگامی) نخستین گام در فرآیند تبادل‌های ژنتیکی در بازیدیومیست‌ها به شمار می‌شود، لذا نپذیرفتن میسلیومی نیز می‌تواند به‌عنوان ابزاری در تفسیر واکنش‌های بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای استفاده شود و در نتیجه می‌توان از این روش برای تشخیص سطوح پایین‌تر از گونه و بررسی جمعیت‌ها نیز استفاده کرد. به‌ویژه اینکه شکل رویشی پایدار *Armillaria* در طبیعت به‌صورت نماریشه و میسلیوم‌های دیپلوئید فرضی دیده می‌شود. لذا این الگوی می‌تواند برای بررسی رفتار بوم‌شناختی گونه‌ها و حتی جمعیت‌های رویشی به‌خوبی استفاده شود. نتایج تلاقی‌های انجام‌شده به خوبی جداسازی گونه‌های *A. mellea*، *A. cepistipes* و *A. gallica* را از هم تأیید می‌کند و به نظر می‌رسد گونهٔ *A. gallica* ایرانی به‌رغم ارتباط تبارزایی نزدیک با گونهٔ *A. cepistipes*، از نظر باروری به‌طورکلی جدا است. لذا این دو گونه حتی درصورتی‌که در آشیان بوم‌شناختی (نیچ اکولوژیک) یکسان قرار گیرند، توانایی آمیزش را نخواهند داشت.

نتایج این تحقیق یافته‌های ما برای درک رده‌بندی (سیستماتیک) جنس *Armillaria* در آسیا، به‌ویژه در ایران که در آن این گروه قارچ‌ها بسیار کم بررسی شده‌اند، را افزایش می‌دهد. بر پایهٔ این تحقیق به نظر می‌رسد ارتباط بین گونهٔ *A. gallica* به‌دست‌آمده از ایران و *A. cepistipes* اروپایی ارتباطی آشکار و با ناسازگاری کامل است. دو گونهٔ یادشده به‌رغم ویژگی‌های ظاهری مشترک جدایی تولیدمثلی دارند که در نخستین مراحل تن‌آمیزی به‌طور آشکار و مشخص دیده می‌شود. تفسیر مبنی بر سازگاری گونهٔ *NABS XI* آمریکای شمالی با *A. cepistipes* اروپایی، قطعیت آرایه‌بندی کمی دارد (Banik *et al*., 1998). وجود سازگاری نسبی بین این دو گونه می‌تواند به علت تکامل نداشتن بازدارنده‌های تولیدمثلی در جمعیت‌های دگربوم (آلوپاتریک) باشد. لذا این دو جمعیت می‌توانند همچنان درصدی از سازگاری جنسی را نشان دهند. سازگاری جنسی ممکن است در صورت جدایی جغرافیایی بین جمعیت‌ها، باقی بماند و این جمعیت‌ها ممکن است به‌اندازهٔ زیادی در صفاتی غیر از سازگاری جنسی افتراق حاصل کنند (Vilgalys *et al*., 1991; Peterson *et al*., 1995). این مسئله یکی از محدودیت‌های مفهوم گونهٔ بیولوژیک در تعیین حدود و دامنهٔ گونه‌ها است. بنابراین ارتباط بین گونهٔ *A.cepistipes* اروپا و *NABS XI* به‌دست‌آمده از آمریکای شمالی نیز باید به‌صورت جدی ارزیابی شود. همان‌طور که بررسی‌های اخیر (Brazee *et al*., 2011) نیز نشان داده است که *NABS X* به‌عنوان یک گونهٔ جداگانه و به نام *A. altimontana* در نظر گرفته شده است. استفاده از ابزار مولکولی دقیق مانند توالی ژن EF-1α می‌تواند ارتباط گونه‌های موجود در خوشهٔ Gallica را بهتر مشخص کند.

نتایج این تحقیق سازگاری جنسی گونه‌های *A. gallica* و *A. mellea* ایرانی را با همتای اروپایی‌شان نشان می‌دهد. بااین‌حال بررسی‌های تبارزایی دقیق‌تری لازم است تا حدود این گونه‌ها را مشخص کند. تبادل‌های چوب و مواد گیاهی به‌آسانی از کشورهای همسایه مانند روسیه و دیگر کشورهای اروپایی با ایران صورت می‌گیرد. درصورتی‌که این گونه‌ها از نظر تبارزایی جداگانه بوده ولی ممکن است همچنان توانایی باروری را حفظ کرده باشند، قابلیت ایجاد گونه‌های زیانبار در صورت ورود این گونه‌ها افزایش خواهد یافت. لذا تمهیدهای قرنطینه‌ای باید به‌طور جدی در مورد این گونه‌ها اعمال شود.

ارزیابی تلاقی‌ها به‌طورمعمول بر پایهٔ ظاهر پرگنه و به‌صورت واکنش‌های مثبت، منفی و مبهم صورت می‌گیرد. واکنش‌های مثبت پرگنه به هم‌پیوسته و چرمی به رنگ قهوه‌ای و بدون تمایز دو پرگنهٔ هاپلوئید را ایجاد می‌کنند. درحالی‌که واکنش‌های منفی با حفظ ظاهر پنبه‌ای در پرگنه و نشان دادن یک خط تیره که دو پرگنه را از هم جدا می‌کند، مشخص می‌شوند. ولی گاهی حالت‌هایی مشاهده می‌شود که یک پرگنهٔ هاپلوئید و پرگنهٔ دیگر ظاهر چرمی قهوه‌ای دارد. در تفسیر صورت گرفته، این تلاقی‌ها مبهم در نظر گرفته شدند (Banik *et al.*, 1998). در این تحقیق نیز این حالت در مورد چند جدایهٔ استاندارد از جمله جدایهٔ KK09043/2 از گونهٔ *A. cepistipes* و جدایهٔ KN10028/1 از گونهٔ *A. gallica* ملاحظه شد. ولی با مقایسه با پرگنهٔ مرجع مشخص شد که این پرگنه‌ها به‌طور خودبه‌خود و پس از گذشت زمان از حالت پنبه‌ای به چرمی تغییر می‌کنند، لذا ظهور چنین پدیده‌ای دلیل بر سازگاری نیست. این پدیده در *Armillaria* مشاهده شده است که پرگنه‌های هاپلوئید به‌مرور زمان به‌صورت پرگنهٔ چرمی در می‌آیند. به نظر می‌رسد این پرگنه‌ها به‌مرور زمان به‌صورت هاپلوئید دو هسته‌ای درآمده، ولی همچنان رفتاری همانند هاپلوئید دارند و می‌توانند با اطمینان در آزمون‌های آمیزشی استفاده شوند. استفاده از یاخته‌سنجی (cytometry) به روش Flow laser می‌تواند برای تأیید این مطالب سودمند باشد (Kim *et al.*, 2001).

در تلاقی‌های درون‌گونه‌ای *A. gallica* ایرانی درصد قابل‌توجهی واکنش نیمه سازگار مشاهده شد. سویه‌های *A. gallica* شامل V2-92، V2-3، V4 و V5 از فاصله‌های بسیار نزدیک جداسازی شده‌اند و این مسئله می‌تواند احتمال بروز واکنش‌های نیمه سازگار بین جدایه‌ها به علت اشتراک در آلل‌هایآلل تیپ آمیزشی را افزایش دهد.

در بررسی قابلیت اطمینان استفاده از مفهوم گونهٔ بیولوژیک در جداسازی گونه‌های ایرانی می‌توان چنین بیان کرد که این مفهوم همچنان می‌تواند در تعیین حدود و دامنهٔ گونه استفاده شود، ولی الگوی انتخاب جدایه‌ها باید به‌طور درستی صورت گیرد. استفاده از جدایه‌های مرجع بین‌قاره‌ای و همچنین جدایه‌های بسیار نزدیک الگوی مناسبی برای بررسی مفهوم گونهٔ بیولوژیک نیست و شانس بروز واکنش‌ها مثبت و منفی دروغین را افزایش می‌دهد. همواره باید به این نکته نیز توجه داشت که آزمون‌های سازگاری جنسی و تن‌آمیزی در این جنس تابه‌حال در محیط‌های آزمایشگاهی (*in vitro*) صورت گرفته، ولی اطلاعات کافی در مورد رفتار بیولوژیک گونه‌ها در بوم‌نظام‌های طبیعی در دسترس نیست. به‌طور آشکار، خیلی از پرسش‌ها در زمینهٔ نظام آمیزشی در *Armillaria* و رفتار بیولوژیک گونه‌های این جنس همچنان بدون پاسخ باقی می‌ماند. تعیین توالی آلل‌ها یا آلل تیپ آمیزشی می‌تواند اطلاعات سودمندی را در زمینهٔ کمک به شناخت این سیستم در *Armillaria* ارائه دهد.

بهترین شیوه برای بررسی‌های آرایه‌بندی در این جنس استفاده همزمان از چندین روش آرایه‌بندی است. به‌طورقطع گونه‌های جدیدی در ایران وجود دارند که می‌توانند با استفاده از تلفیق روش‌های بیولوژیک و دیگر ابزارهای آرایه‌بندی در دسترس مانند توالی ژن‌های کدکنندهٔ پروتئین تشخیص و نام‌گذاری شوند. یافته‌های به‌دست‌آمده از این تحقیق اطلاعات سودمندی را درزمینهٔ شناخت بهتر مفهوم بیولوژیک گونه در جنس *Armillaria* ازجمله چگونگی ارزیابی تعامل‌های درون و بین‌گونه‌ای در واکنش‌های سازگار و یا ناسازگار جنسی و رویشی، نحوهٔ کاربرد و قابلیت این مفهوم در تعیین حدود و دامنهٔ گونه‌ها به‌ویژه در خوشهٔ Gallica در اختیار ما قرار می‌دهد. کاربرد مفهوم گونهٔ بیولوژیک می‌تواند گام مؤثری در جهت شناخت ظرفیت و قابلیت تکاملی و تهاجمی گونه‌ها به‌شمار آید.

REFERENCES

1. Anderson, J. B. & Ullrich, R. C. (1979). Biological species of *Armillaria mellea* in North America. *Mycologia*, 71, 402-14.
2. Antonin, V., Tomsovsky, M., Sedlak, P., Majek, T. & Jankovsky, L. (2009). Morphological and molecular characterization of the *Armillariacepistipes-gallica* complex in the Czech Republic and Slovakia. *Mycological Progress*, 8, 259-271.

3. Asef, M. R., Mohammadi Goltapeh, E. & Alizadeh, A. (2003). Identification of *Armillaria* biological species in Iran. *Fungal Diversity*, 14, 51-60.
4. Banik, M. T. (1996). *Armillarianabsnona*, a new species from western North America. *Mycologia*, 88, 484-491.
5. Banik, M. T. & Burdsall, H. H. (1998). Assessment of compatibility among *Armillaria cepistipes, A. sinapina*, and North American Biological species X and XI using culture morphology and molecular biology. *Mycologia*, 90, 798-805.
6. Berubee, J. A., Dessureault, M., Betthelay, S. & Guillaumin, J. J. (1996). Interfertility between *Armillaria cepistipes and A. sinapina*. *Phytoprotection*, 77, 67-74.
7. Brazee, N. J., Helvey, J. P. & Wick, R. L. (2011). Evaluation of partial tef1, rpb2, and nLSU sequences for identification of isolates representing *Armillaria calvescens* and *Armillaria gallica* from northeastern North America. *Fungal Biology*, 115, 741-749.
8. Coetzee, M. P. A., Wingfield, B. D. & Zhao, J., Van Coller, S. J., Wingfield, M. J. (2015). Phylogenetic relatioship among biological species of *Armillaria* from China. *Mycoscience*, 56(5), 530-541.
9. Davari, M. & Askari, B. (2005). *Armillaria mellea* as a cause of oak decline in Hatam-baigh forest of Iran. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 70(3), 295-304.
10. Dumas, M. T. (1998). Biological species of *Armillaria* in the mixed wood forest of northern Ontorio Canada. *Canadian Journal of Forest Research*, 18, 872-874.
11. Ferguson, B. A., Dreisbach, T. A., Parks, C. G., Filip, G. M. & Schmitt, C. L. (2003). Coarse-scale population structure of pathogenic *Armillaria* species in a mixed-conifer forest in the Blue Mountains of northeast Oregon. *Canadian Journal of Forest Research*, 33, 612-623.
12. Fox, R. T. V. (2000). Pathogenicity, Chapter 6. pp. 113-136 in Fox, R. T. V., ed. *Armillaria* Root Rot: Biology and Control of Honey Fungus. Intercept Limited, Andover, UK. 222 p.
13. Hasegawa, H., Ota, Y. & Kikuchi, T. (2010). Sequence based identification of Japanes *Armillaria* species using the elongation factor-1 alpha. *Mycologia*, 102(4), 895-910.
14. Hintikka, V. (1973). A note on the polarity of *Armillariella mellea*. Karstenia, 13, 32-39.
15. Kile, G. A. & Watling, R. (1998). Identification and occurrence of Australian *Armillaria* species including *A. pallidula* sp. nov.and comparative studies between them and non- Australian tropical and Indian *Armillaria*. *Transaction of the British Mycological Society*, 91, 305-315.
16. Kim, M. S. & Klopfenstein, N. B., Hanna, J. W., McDonald, G. I. (2006). Characterization of North American *Armillaria* species: genetic relationships determined by ribosomal DNA sequences and AFLP markers. *Forest Pathology*, 36, 145-164.
17. Kim, M-S., Klopfenstein, N. B., McDonald, G. R., Arumuganathan, K. & Vidaver, A. K. (2001). Use of flowcytometry, flouresence microscopy and PCR-based techniques to assessintras pecific and interspecific matings of *Armillaria* species. *Mycologica Research*, 105, 153-163.
18. Korhonen, K. (1978). Interfertility and clonal size in the *Armillariella mellea* complex. *Karstenia*, 18, 31-42.
19. Korhonen, K. (1995). *Armillaria* since Elias Fries. Acta Univ.symb. Bot. Ups. (pp.: 153-161).
20. Morrison, D. J., Chu, D. & Johnson, A. L. S. (1985). Species of *Armillaria* in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7(3), 242-246.
21. Ota, Y., Matsushita, N., Nagasawa, E., Terashita, T., Fukuda, K. & Suzuki, K. (1998)**.** Biological species of *Armillaria* in Japan. *Plant Disease*, 82, 537-548.
22. Ota, Y., Sotome, K. & Hasegawa, E. (2009). Seven *Armillaria* species identified from Hokaido Island, Northern Japan. *Mycoscience*, 50, 442-447.
23. Peterson, R. H. (1995). There is more to a mushroom than meets the eye: mating studies in the *Agaricales. Mycologia*, 87, 1-17
24. Qin, G. F., Zhao, J. & Korhonen, K. (2007). A study on intersterility groups of *Armillaria* in china. *Mycologia*, 99(3), 430-441.
25. Shaw, C. & Klie, A. (1991). *Armillaria* root disease. Agricultural Hand book. No.691, USDA Forest Service, Washington, USA.
26. Smith, M. L., Bruhn, J. N. & Anderson, J. B. (1992). The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature*, 356, 428-431.
27. Vilgalys, R. (1991). Speciation and species concept in the *Collybiadryophila* complex. *Mycologia*, 83, 758-773.
28. Worall, J. J. (1991). Media for selective isolation of Hymenomycetes. *Mycologia*, 83(3), 296-302.
29. Worall, J. J. (1997). Somatic incompatibility in basidiomicetes. *Mycologia*, 89, 24-36.