



مقاله پژوهشی

بررسی روش‌های مختلف برای شناسایی ژنوتیپ‌های گونه‌های جنس *Armillaris* (قارچ عسلی)

سپیده قهاری*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): sghahari3@gmail.com

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۱

<https://doi.org/10.30495/jdb.2023.1975728.1347>

چکیده

هدف از مطالعه اخیر مقایسه SI با استفاده از سه روش دیگر برای تمایز ژنوتیپ‌ها است که عبارتند از: روش چند شکلی قطعات DNA حاصل از تکثیر تصادفی (RAPD)، بررسی ال‌های تیپ - آمیزشی^۱ و آنالیز ایزوآنزیم‌ها RAPD و ال‌های تیپ - آمیزشی در ۷۳ ایزوله، که متعلق به ۳۶ ژنوتیپ شناسایی شده بر اساس آنالیز بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. بررسی تعداد محدودی از ایزوله‌ها با استفاده از پلی مورفیسم ایزوآنزیم انجام شد. RAPDs، ال‌های تیپ آمیزشی و SI در هر سه مورد ایزوله‌های تمایز یافته از طریق واکنش‌های SI شامل دو زیرگروه با فنوتیپ‌های RAPD متفاوت بودند. در دو مورد گروه‌های تمایز یافته از طریق واکنش‌های SI مجموعه مشابهی از ال‌های تیپ آمیزشی را به اشتراک گذاشتند. آنالیز ایزوآنزیم نشان دهنده تفاوت‌های بین گونه‌ای و تفاوت‌های ناچیز بین ژنوتیپ‌های یک گونه یکسان بود. این یافته‌ها باعث شده تا استفاده از SI به عنوان روشی روتین و معتبر برای مطالعات اپیدمیولوژیک گونه‌های *Armillaria* در نظر گرفته شود. در گروه یکسانی از ایزوله‌ها، پروفایل‌های قطعه *EcoRI* مربوط به DNA میتوکندری نیز بررسی شدند. این آنالیز ژنوتیپ‌ها را مجدداً در 'تیپ‌های میتوکندریایی' گروه‌بندی کرد که سیتوپلاسم معمولی را به اشتراک گذاشته و احتمالاً از طریق تولید مثل جنسی ارتباط نزدیکی با یکدیگر دارند.

کلیدواژه‌ها: گونه‌های جنس *Armillaris*، ژنوتیپ‌ها، RAPD، RFLP، ال‌های تیپ - آمیزشی.

¹ mating-type alleles

مقدمه

امروزه رویکرد ژنتیک جمعیت به شکلی وسیع‌تر برای حل مشکلات اکولوژی^۱ و اپیدمیولوژی پاتوژن‌های^۲ قارچی، به ویژه گونه‌های پراکنده به فرم رویشی در خاک، مورد استفاده قرار می‌گیرد. در بین چنین قارچ‌هایی، گونه‌های جنس *Armillaria* توجه خاصی را به خود معطوف نموده‌اند [۱]. محققین از طریق مطالعه قلمروهای اجتماعات گونه‌های مختلف *Armillaria* به نتایجی در مورد اکولوژی و اپیدمیولوژی این قارچ‌ها دست یافته‌اند [۲].

در گذشته دو روش اصلی برای شناسایی ژنتیک هر یک از گونه‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند: (الف) واکنش‌های ناسازگاری سوماتیک، (ب) الل‌های تیپ - آمیزشی. روش اول نخستین بار توسط Korhonen در سال ۱۹۷۸ [۳] و سپس توسط Kile (در سال ۱۹۸۳ و ۱۹۸۶) [۴]، Thompson در سال ۱۹۸۴، Hood [۵] و Sandberg در سال ۱۹۸۷ [۶]؛ و Berthelay در سال ۱۹۹۰، Marxmuller، Holdenreider و Muller در سال ۱۹۹۰، Klein-Gebbnick، Blenis و Hiratsuka در سال ۱۹۹۱، و Rizzo و Harrington در سال ۱۹۹۳ استفاده شد [۷-۱۰]. روش پرمشقت تر شامل شناسایی الل‌های تیپ آمیزشی است که توسط Korhonen در سال ۱۹۷۸، Ulrich و Anderson در سال ۱۹۷۸، همکاران در سال ۱۹۷۹، Kile در سال ۱۹۸۳ و Berthelay و Guillaumin در سال ۱۹۸۵ مورد استفاده قرار گرفت [۱۱-۱۵]. محققینی که از هر دو روش در کارهای مطالعاتی خود استفاده نموده‌اند عبارتند از Korhonen در سال ۱۹۷۸، Kile در سال ۱۹۸۳، و Guillaumin و Berthelay در سال ۱۹۹۰، در تمامی این مطالعات به استثنای کار مطالعاتی Kile در سال ۱۹۸۳، معمولاً تعریف یکسانی برای ژنوتیپ‌ها در نظر گرفته شد. مارکرهای مولکولی^۳، که به شکلی فزاینده برای مشخص نمودن گروه بندی‌های درون گونه ای قارچ‌های عالی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Kohli et al., 1995; Vilgalys, 1991; Garbelotto et al., 1993; Karlson, 1993; Jacobson, 1993; Niller & Turner, 1993)، در کار مطالعاتی Smith و

همکاران در سال ۱۹۹۰ نیز برای شناسایی گونه‌های *Armillaria* به کار گرفته شده‌اند. این محققین با تعریف تخصیص داده شده به ژنوتیپ‌ها از طریق الل‌های تیپ آمیزشی در جمعیتی از گونه‌های *Armillaria* به مقایسه هاپلوتیپ‌های^۴ mtDNA پرداختند. با وجود این که mtDNA سیتوپلاسمی بوده و تیپ‌های آمیزشی توسط DNA هسته کد می‌شوند، اما محققین تطابق کامل بین تیپ‌های mtDNA با نقشه‌های ژنوتیپی مبتنی بر الل‌های تیپ آمیزشی را مشاهده کردند. به نظر می‌رسد که حداقل در برخی از جمعیت‌ها، mtDNA به اندازه کافی برای تمایز اغلب یا حتی تمام ژنوتیپ‌ها پلی مورفیک^۵ باشد. با این وجود پلی مورفیسم همیشه برای تمایز گونه‌ها الزامی نیست. در کار مطالعاتی جدیدتری در سال ۱۹۹۴، Bruhn، Smith و Anderson دریافتند که در گونه‌های با ژنتیک متفاوت یک جمعیت محلی تیپ‌های mtDNA ممکن است مشترک باشند.

انتقاد اصلی وارد شده به تست ناسازگاری سوماتیک این است که درجه تفکیک در تمایز ژنوتیپ‌ها به تعداد لوکوس‌های^۶ تعیین کننده فنوتیپ و الگوی آمیزشی در جمعیت بستگی دارد. این اطلاعات بحرانی و مهم از طریق شانس توارث عوامل تعیین کننده یکسان، احتمال همسانی فنوتیپ SI و بدین ترتیب ضریب اطمینان دقت تست‌های SI در تمایز ژنوتیپ‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در اغلب جمعیت‌های بازیدیومیست^۷، این اطلاعات بحرانی و مهم در دسترس نیستند. در بسیاری از موارد، گروه‌های ناسازگاری زیستی ممکن است شامل ژنوتیپ‌های متعدد با منشاء مستقل از یکدیگر باشند. این ویژگی قطعا در مورد آسکومیست‌هایی^۸ مانند *Cryphonectria parasitica* (Anagnostakis, 1983) و *Ophiostoma ulmi* (Brasier, 1983) و در قارچ هتروبازدیدیومیست^۹ *Rhizoctonia solani* نیز وجود دارد، در این قارچ‌ها گروه‌های سازگاری شامل ایزوله‌هایی هستند که در سایر خصوصیات ژنتیکی با یکدیگر تفاوت دارند. با این وجود، به نظر در هوموبازیدیومیست‌ها^{۱۰} تست ناسازگاری سوماتیک روش دقیق تری برای تفکیک هر یک

⁴ Haplotypes

⁵ Polymorphic

⁶ Loci

⁷ basidiomycetes

⁸ ascomycetes

⁹ heterobasidiomycete

¹⁰ Homobasidiomycetes

¹ Ecology

² Pathogen

³ Molecular markers

به عنوان باقی مانده‌های یک ژنوتیپ بزرگتر، قدیمی مدنظر قرار می‌گیرند (Kile, 1983; Legrand, Ghahari & Guillaumin, 1966). با این وجود، چنین گونه‌هایی می‌توانستند ژنوتیپ‌های متفاوتی باشند که به واسطه نیای خود ارتباط نزدیکی با یکدیگر دارند.

هدف کلی ما درک نحوه پاسخدهی جمعیت‌های گونه‌های *Armillaria* نسبت به تغییرات آتروپوژنیک^۶ طبیعی در اکوسیستم‌های جنگلی است. در این مطالعه از یک جنگل کوهستانی درختان راش به عنوان مدلی برای مطالعه استفاده کردیم. در کار مطالعاتی قبلی (Legrand, Ghahari, Guillaumin 1966)، از روش SI برای تهیه نقشه ژنوتیپ‌های گونه‌های *Armillaria*، در چهار جنگل کوهستانی واقع در ماسیف مرکزی (مرکز فرانسه) استفاده کردیم. در مجموع ۷۶۴ ایزوله از گونه‌های *Armillaria* بین ۵۸ ژنوتیپ از *A. ostoyae*، ۳۶ ژنوتیپ *A. cepistipes* و ۱۵ ژنوتیپ *A. gallica* توزیع شده بودند. تقریباً تمامی جفت‌های سوماتیک بوضوح واکنش‌های سازگاری یا واکنش‌های ناسازگاری بودند. تنها چهار جفت در گونه *A. ostoyae* واکنش‌های حدوسط را نشان دادند. هدف از این مطالعه مقایسه قابلیت‌های نسبی واکنش‌های SI و سایر روش‌ها برای تمایز ژنوتیپ‌ها بین ایزوله‌ها است. تعدادی از ایزوله‌های انتخاب شده متعلق به سه گونه از جنس *Armillaria* بودند و خاستگاه آن‌ها سه توده جنگلی از چهار توده جنگلی بررسی شده در کار مطالعاتی قبلی ما بود. این ایزوله‌ها به شکل آزمایشی با به کارگیری روش‌های زیر مجدداً طبقه بندی شدند: (الف) آنالیز DNA میتوکندری از طریق RFLP، (ب) آنالیز DNA هسته از طریق RAPD و (پ) آنالیز ال‌های تیپ آمیزشی. آنالیز ایزوآنزیم تعداد اندکی از ایزوله‌ها نیز انجام شد.

مواد و روش‌ها

مکان‌ها

سه منطقه‌ای که خاستگاه ایزوله‌ها بودند (یعنی وال بلیکس^۷، لا مورانژی^۸، کل دی سیسات^۱) به طور کامل در کار مطالعاتی قبلی

از ژنوتیپ‌ها باشد. این وضعیت ممکن است تا اندازه ای ناشی از این واقعیت باشد که در این گروه از قارچ‌ها، (به دلیل آمیزش دو هاپلوئید) پاسخ SI در وضعیتی بین میسلیوم‌های دی کاریوتی یا دیپلوئیدی^۱ تست شده و در چنین شرایطی هر دو هسته در سازگاری سوماتیک نقش دارند. با این وجود، چنین ادعایی از تائید آزمایشی پائینی برخوردار است، چون مبنای ناسازگاری سوماتیک در بازیدیومیست‌ها تا اندازه زیادی ناشناخته باقی مانده است. بسیاری از گونه‌های آسکومیست مانند *Neurospora crassa*، *Ophiostoma ulmi*، *Podospora anserina*، گونه‌های *Aspergillus parasitica* از این جنبه مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Esser & Elaich, 1973; Perkins, 1988; Glass & Kuldau, 1992, Leslie, 1993).

مورد خاص و مشکوک این است که آیا تست‌های سازگاری سوماتیک قادر به تمایز ژنوتیپ‌های مرتبط با یکدیگر از طریق درون آمیزی^۲ هستند یا خیر (Rees, 2021). به عنوان مثال، دو دیپلوئید ایجاد شده از یک والد احتمالاً در لوکوس‌های ناسازگاری ال‌های زیادی را به اشتراک می‌گذارند، حتی اگر والد در این لوکوس‌ها تا اندازه ای هتروزیگوت^۳ باشد. استفاده از ال‌های تیپ - آمیزشی به عنوان مارکر قادر به حل این مشکل نیست، چون دیپلوئیدهای به وجود آمده از طریق آمیزش بین گونه‌های هم نیا^۴ حامل ال‌های مشابه A و B شبیه به والد دیپلوئید اصلی هستند.

محدودیت‌های هر دو روش به شکل بالقوه مشکل جدی برای مطالعه جمعیت‌های گونه *Armillaria* محسوب می‌شود. این می‌توانست بدان معنا باشد دو روش فوق الذکر تنها قادر به شناسایی ژنوتیپ‌های جدیدی هستند که منشاء آن‌ها برون آمیزی^۵ است (یعنی حاصل آمیزش دو هاپلوئید به وجود آمده از دو ژنوتیپ متفاوت هستند)، و قادر به شناسایی ژنوتیپ‌های جدید با منشاء درون آمیز نمی‌باشند. در نتیجه، تفسیر نواحی با عدم پیوستگی فضایی که با برخی از ژنوتیپ‌های گونه‌های *Armillaria* اشغال شده کار مشکلی است. این گونه‌ها معمولاً

¹ dikaryotic or diploid mycelia

² Inbreeding

³ heterozygotic

⁴ Siblings

⁵ Outbreeding

⁶ anthropogenic

⁷ Valbelex

⁸ La Morangie

آنالیز ایزوآنزیم

در این مطالعه هفت آنزیم مورد بررسی قرار گرفتند، از این میان ۵ آنزیم بر روی ژل نشاسته ۱۲% آنالیز شدند: مالات دهیدروژناز^۵ (MDH)، استراز^۶ (EST) و فسفوجلوکوموتاز^۷ (PGM) و اسید فسفاتاز^۸ (ACP)، سوپر-اکسید دیسموتاز^۹ نیز بر روی ژل‌های مورد استفاده برای PGM و MDH شناسایی گردید. دو آنزیم گلوتامات دهیدروژناز^{۱۰} (NAD-GDH و NADP-GDH) بر روی ژل پلی آکرلامید مطالعه شدند.

فرایند استخراج با استفاده از بافر تریس^{۱۱} با pH معادل ۷/۰ حاوی DTT (۱۵ میلی گرم)، EDTA (۷۵ میلی گرم) و بتا-مرکاپتواتانول^{۱۲} (۰/۱ میلی لیتر) انجام شد. برای تهیه ژل و جابجایی قطعات DNA بافرهای متعددی ارزیابی شدند: که از این بین بافر تریس-مالنات-EDTA (pH معادل ۷/۲) بهترین نتایج را به همراه داشت. جابجایی دمای ۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت با ولتاژهای مختلف، و حفظ توان در مقدار ۱۰ ولت، رخ داد. موقعیت مکانی فعالیت‌های آنزیمی مطابق با کار مطالعاتی Pasteur و همکاران در سال ۱۹۸۷ بودند. در مورد آنزیم‌های استراز^{۱۳}، راجنت مورد استفاده شامل آلفا-نفتیل-پروپیونات^{۱۴} (۱%) و بتا-نفتیل-پروپیونات (۱%) بود. در مورد الکتروفورز NAD-GDH و NADP-GDH، غلظت پلی آکرلامید^{۱۵} برای ژل متراکم کننده^{۱۶} ۱/۵% و غلظت آن برای ژل جداکننده^{۱۷} ۶% بود. جابجایی و حرکت قطعات DNA در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد و ولتاژ ۱۵۰ به مدت یک ساعت، و سپس ۱۰۰ ولت به مدت ۴ ساعت رخ داد. بافر مورد استفاده برای جابجایی تریس - گلیسین^{۱۸} بود. باندهای مربوط به فعالیت‌های آنزیمی با استفاده از سیستم سنجش تترازولیموم^{۱۹} موقعیت‌یابی

توصیف شده بودند (Legrand et al., 1996). وال بلیکس و لا مورانژی به ترتیب جنگل‌های نژاد خالص راش، در ارتفاعات ۸۵۰ و ۱۲۲۰ متری هستند. گونه‌های *Armillaria gallica* و *A. cepistipes* در هر دو مکان وجود دارند. در لا مونژی گونه *A. ostepoyae* نیز موجود است. کل دی‌سیسات کشتزاری متشکل از درختان نژاد ۶۰ ساله است که در یک توده جنگلی از درختان راش قرار دارد. در این منطقه سه گونه *A. gallica*، *A. cepistipes* و *A. ostepoyae* حضور دارند، به علاوه *A. ostepoyae* شایع‌ترین گونه بوده و مانند یک انگل ضعیف رفتار می‌کند.

آنالیز DNA میتوکندری با تکنیک RFLP

این روش برای بررسی جمعیت‌های طبیعی جنس *Armillaria*، که توسط Smith و همکاران در سال ۱۹۹۰ توصیف شده، استفاده می‌شود.

کل DNAهای سلول استخراج شده، و سپس قبل از الکتروفورز روی ژل آگارز^۲ ۷% فرایند هضم آنزیمی به کمک با آنزیم محدودکننده *EcoRI* انجام گردید. با استفاده از روش هیبریداسیون ساترن^۳ و نشاندار کردن DNA میتوکندری با ترکیبات رادیواکتیو الگوی قطعه DNA محدود شده ایزوله 430-1 گونه *A. ostepoyae* مشاهده شد (Anderson,) (Petsche & Smith, 1987).

آنالیز DNA هسته با تکنیک RFLP

کل DNA سلول با استفاده از روش چند شکلی قطعات DNA حاصل از تکثیر تصادفی (RAPD) و مطابق با پروتکل Smith، Bruhn و Anderson در سال ۱۹۹۲ ارزیابی شدند. سه پرایمر^۴ دلخواه که در این پروتکل مورد استفاده قرار گرفته بودند عبارتند از: پرایمر (ACTTGAGGCG) R-25، پرایمر (ATGGATCCGC) R-28 و پرایمر (CCGGCCTTCC) UBC-31.

⁵ malate dehydrogenase (MDH)

⁶ Esterase (EST)

⁷ phosphoglucumutase (PGM)

⁸ acid phosphatase (ACP)

⁹ Super-oxide dismutase (SOD)

¹⁰ glutamate dehydrogenase

¹¹ Tris

¹² β-mercaptoethanol

¹³ esterase

¹⁴ α-naphtyl-propionate

¹⁵ polyacrylamide

¹⁶ Stacking gel

¹⁷ Resolving gel

¹⁸ Tris-Glycin

¹⁹ tetrazolium assay system

¹ Col de Ceysat

² electrophoresis on 0.7 % agarose gels

³ Southern hybridization

⁴ Primer

شدند (Blumenthal & Smith, 1973).

چهار ژنوتیپ بزرگ MB2، MB3، MB4 و MB5 وجود داشت که در مجموع یک سوم کل منطقه تحت مطالعه را تشکیل می‌دادند.

یافته‌ها

آنالیز DNA میتوکندری

در مجموع ۶۲ ایزوله (از ۷۳ ایزوله موجود) آنالیز شده به شکل پشت سرهم به ۳۲ جنس شناسایی شده از طریق SI تعلق داشتند (جدول ۱). تیپ‌های mtDNA یافت شده نسبت به ژنوتیپ‌های شناسایی شده با استفاده از SI کمتر بودند. در دو مکان مورد مطالعه ۱۹ تیپ mtDNA وجود داشتند. هر تیپ میتوکندریایی شامل یک تا ۵ ژنوتیپ بود، که بر مبنای واکنش‌های SI شناسایی شده بودند. در موقعیت مکانی لا مورانژی تیپ مینوکندری 'f' در

این یافته را به سه شکل قابل تعمیم بود: (الف) تمام ایزوله‌های متعلق به ژنوتیپ یکسان تیپ میتوکندریایی یکسانی بودند؛ (ب) ایزوله‌های متعلق به گونه‌های مختلف همیشه تیپ‌های میتوکندریایی متفاوتی بودند؛ (پ) ایزوله‌های متعلق به مکان‌های متفاوت تیپ‌های میتوکندریایی مختلفی داشتند. در شکل ۱ و شکل ۲ توزیع تیپ‌های mtDNA در هر مکان نشان داده می‌شود. در شکل ۲ منتخبی از الگوهای قطعه محدود شونده ارائه می‌گردد.

جدول ۱. نتایج آنالیز RFLP بر روی DNA میتوکندری ایزوله‌های *Armillaria gallica* و *A. cepistipes* در دو جنگل از درختان راش.

Location/species	mtDNA type	SI genet	Isolates	
Valbelex <i>A. gallica</i>	m	VE1	23, 25, 56, 71, 87	
		VE2	54, 57, 67, 252, 926	
		VE3	24, 36, 121	
	n	VE6	81, 82	
		VE4	13, 15	
		VE5	63, 73	
	<i>A. cepistipes</i>	o	VE4	13, 15
		p	VE5	63, 73
		q	VB1	84, 85
VB4			52	
VB5			43	
VB6			33, 136	
VB8	108			
r	VB9	922		
La Morangie <i>A. gallica</i>	a	ME1	82, 93, 85	
		ME2	26, 45	
<i>A. cepistipes</i>	b	MB1	31, 33, X4	
		MB9	55, Z6	
	c	MB15	66, 908	
	d	MB21	901	
	e	MB7	14	
		MB2	51, 72	
	f	MB3	73, Y4	
		MB4	83, 92, 94	
	g	MB5	86, 95	
		MB16	84	
	h	MB18	43	
		MB19	943, 2512, 53	
	i	MB6	54	
		MB8	24, 34	
i	MB11	12		
k	MB12	22		
l	MB20	108		
s	MB17	61		

آنالیز DNA هسته

دیسوماتاز (SOD) از یکدیگر متمایز شدند. در ایزوله MX4 میزان rF باند تک ایجاد شده در ACP کمتر از MX2 و MY4 بود. از سوی دیگر واکنش SOD (شناسایی شده بر روی ژل‌های PGM و MDH به عنوان رنگ بر محیط)، بر خلاف ایزوله MX4، در مورد ایزوله‌های MX2 و MY4 مشاهده شد. شایان ذکر است که ایزوله‌های MX2 و MY4 به ژنوتیپ‌های سوماتیک متفاوت (MB2 و MB3) و به تیپ میتوکندریایی (f') یکسانی تعلق دارند، در حالی که MX4 (ژنوتیپ MB1) به تیپ میتوکندریایی متفاوتی ('b') تعلق دارد.

الل‌های تیپ آمیزشی

در جدول ۲ الل‌های تیپ - آمیزشی گونه *A. cepistipes* در منطقه لامورائزی، گونه *A. ostoyae* در منطقه لامورائزی، گونه *A. ostoyae* در منطقه کل‌دی‌سیسات لیست می‌شوند.

در هر دو گونه متعلق به منطقه لامورائزی، ژنوتیپ‌ها تعریف شده از طریق الل‌های تیپ وحشی دقیقاً مشابه ژنوتیپ‌های تعریف شده با روش SI بودند. ژنوتیپ‌ها حداقل در سه الل، و در اغلب موارد، در هر چهار الل با یکدیگر تفاوت داشتند.

در بین هشت ژنوتیپ گونه *A. cepistipes*، MB3 و MB5 (متعلق به تیپ میتوکندریایی یکسان) به شکل متداول تنها یک الل B داشتند و MB3 نیز تنها یک الل A مشترک با MB12 داشت. ژنوتیپ MB12 دارای یک الل B مشترک با MB15 و MB1 و نیز یک الل مشترک A با MB8 بود. در مجموع هشت ژنوتیپ، ۱۴ الل A و ۱۴ الل B را به اشتراک گذاشتند (حداکثر الل احتمالی: ۱۶).

یافته‌های مشابهی در مورد گونه *A. ostoyae* به دست آمد. ژنوتیپ MC3 دارای یک فاکتور مشترک A با ژنوتیپ MC2 بود و فاکتور A مشترک دیگری با MC7 داشت؛ به علاوه دارای یک الل B مشترک بین MC2 و MC8 و یک الل مشترک دیگر با MC4 و MC7 بود. شش ژنوتیپ مجموعاً ۹ الل A و ۱۰ الل B مشترک داشتند (حداکثر الل احتمالی: ۱۲).

به نظر می‌رسد که در منطقه کل‌دی‌سیسات، یافته‌ها پیچیده تر باشند. برای دو جفت ژنوتیپ (SC5 و SC7؛ SC8 و SC9) واکنش‌های سوماتیک نقش حدواسط بین سازگاری‌ها و ناسازگاری‌های مشاهده شده را دارند. هر یک از این جفت

تمامی ۷۳ ایزوله، (متعلق به ۳۶ گونه) با هر سه پرایمر آنالیز شدند (شکل ۳). ژنوتیپ‌ها تمایز یافته از طریق SI می‌توانستند از طریق الگوهای آمپلیکون خود از یکدیگر متمایز شوند. حداقل زمانی که یافته‌های به دست آمده از هر سه پرایمر به شکل تجمعی مدنظر قرار می‌گرفتند، اثرانگشت ژنی هر ژنوتیپ به شیوه‌ای منحصر بفرد تعیین می‌شد. در برخی موارد، تمایز ژنوتیپ‌ها فقط با دو پرایمر، یا حتی یک پرایمر، امکان پذیر بود؛ به عنوان مثال پرایمر UBC31 برای تمایز تمامی ژنوتیپ‌های *A. gallica* متعلق به منطقه وال بلیکس کافی بود.

به طور کلی، ایزوله‌های مختلف یک ژنوتیپ سوماتیک یکسان با هر پرایمری اثرانگشت RAPD یکسانی داشتند. با این وجود، سه استثناء مورد توجه قرار گرفتند: (الف) یکی از شش قطعه متعلق به ژنوتیپ E2 (*A. gallica*) در منطقه وال بلیکس متفاوت از ۵ قطعه دیگر این ژنوتیپ به نظر رسیدند (اگر چه این تفاوت با هر سه پرایمر مشاهده شد اما در مورد پرایمر R28 این تفاوت کمتر مشهود بود؛ (ب) دو ایزوله ژنوتیپ B7 (A. *cepistipes*) در منطقه لامورائزی، که از دو سمت جاده جمع آوری شده بود، با پرایمر R28 الگوی متفاوتی را نشان داد، اما با پرایمرهای R25 و UBC31 الگوها مشابه بودند؛ (پ) در دو ایزوله ژنوتیپ VB1 گونه *A. cepistipes* منطقه وال بلیکس وضعیت یکسانی وجود داشت؛ با این تفاوت که الگوهای آن‌ها فقط با پرایمر UBC31 متفاوت بود.

آنالیز ایزوآنزیم

اغلب آنزیم‌های مطالعه شده (برای مثال MDH روی ژل نشاسته، NAD-GDH روی PAGE) تفاوت‌های آشکاری را بین سه گونه *Armillaria* نشان دادند.

تفاوت‌های موجود بین ایزوله‌های متعلق به یک گونه یکسان تنها در موارد محدودی آشکار شدند. با استفاده از آنزیم استراز (روی نشاسته) دو گروه در ایزوله‌های *A. gallica* مشاهده شدند، یک گروه که دارای دو باند و گروه دیگر سه باند را نشان می‌داد. یکی از باندها در هر دو گروه شایع بود. سه ایزوله *A. cepistipes* یعنی MX2، MX4 و MY4 (تماماً متعلق به منطقه لامورائزی) به واسطه اسیدفسفاتاز (ACP) و سوپراکسید

هاپلوئیدهای *A. ostoyae* در منطقه کل‌دی‌سیستات با هاپلوئیدهای همان گونه در منطقه لامورانژی آمیزش نداشتند، بنابراین اطلاع نداریم که آیا این دو جمعیت، با فاصله ۳۵ کیلومتری از هم، الل‌های مشترکی دارند یا خیر. برای ساده تر شدن کار اعداد ۱ تا ۱۰، یا ۱ تا ۱۱ به دو توده جنگلی و هر گونه تخصیص داده شد.

ژنوتیپ‌ها الل‌های تیپ-آمیزشی یکسانی را به اشتراک می‌گذارند. به علاوه، SC3 و SC8-SC9 فاکتورهای A یکسان (A5 و A6) و فاکتورهای B متفاوتی دارند. SC1 فاکتور B2 مشترکی با SC8 و SC9 داشت. SC3 و SC10 فاکتور B2 مشترکی داشتند. در مجموع، ۹ ژنوتیپ سوماتیک ۱۲ الل A و ۱۲ الل B داشتند (حداکثر الل احتمالی: ۱۸).

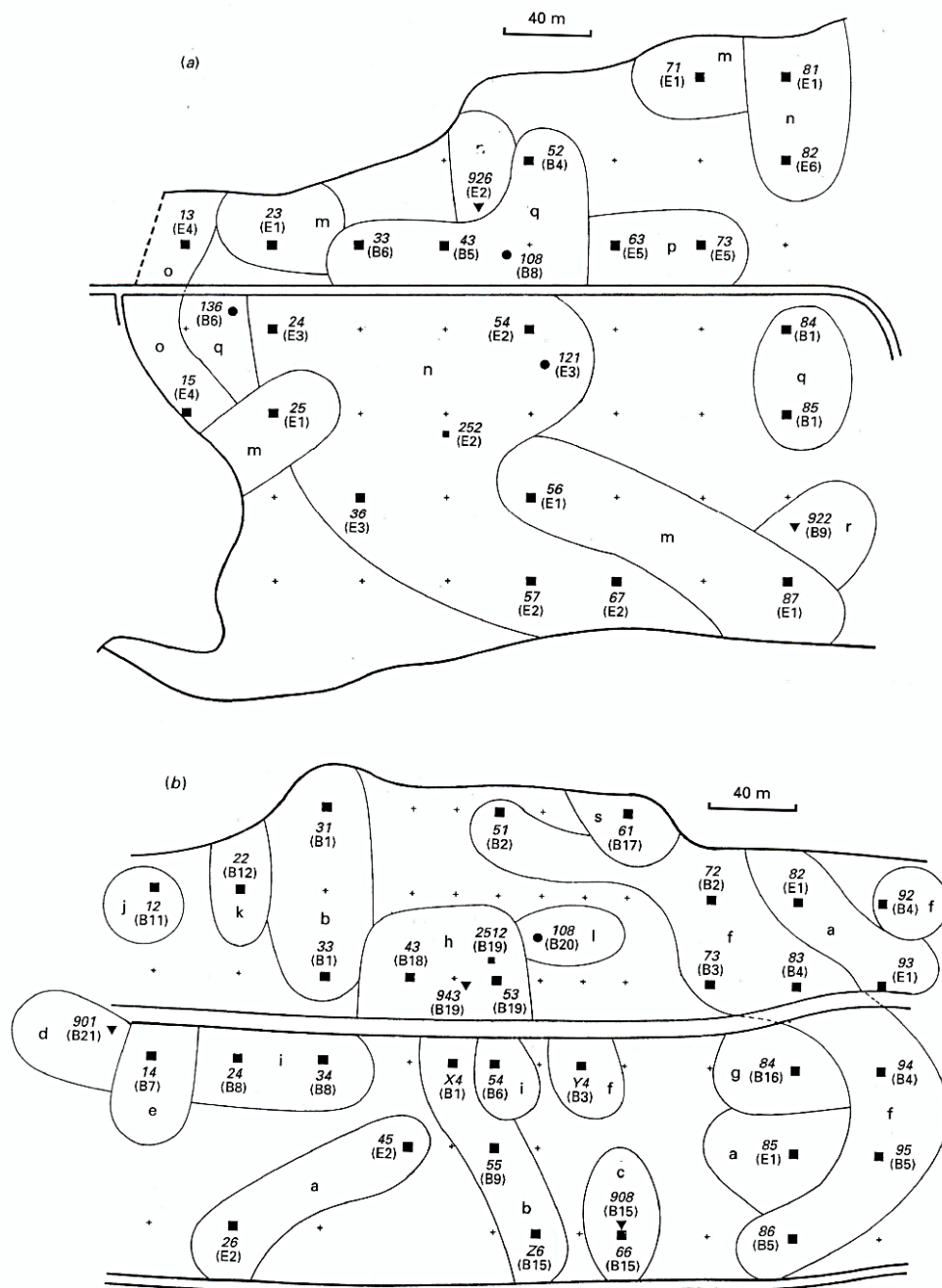


Figure 1. Distribution of mitochondrial DNA types (see Table 1) of *Armillaria cepistipes* (B) and *A. gallica* (E) at (a) Valbelex and (b) La Morangie. The code (e.g. 73 B3) is the isolate number, and the genet as determined by SI analysis. +, Grid mark. Origin of the isolate: ■, rhizomorph; ●, mycelium; ▼, fruiting body.

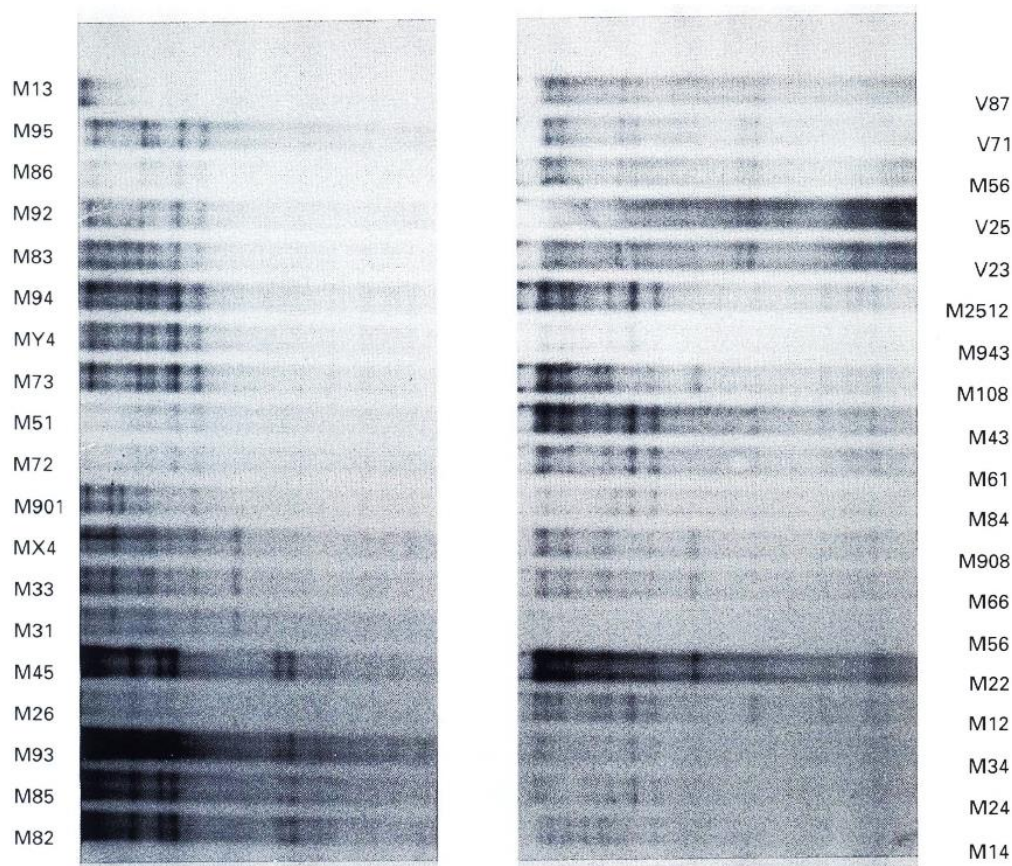


Figure 2. Autoradiograph of EcoRI restriction fragments of mtDNA from 38 isolates of *Armillaria gallica* and *A. cepistipes*. Isolate codes in Table 1.

آزمایشگاهی متفاوت است. در سال ۱۹۹۰ Smith و همکاران مشاهده کردند که کلنی دیپلوئید تشکیل شده از طریق آمیزش دو هاپلوئید وضعیت موزائیکی نسبت به دو تیپ از mtDNAها دارد. اختلاف فاحش موجود بین آمیزش‌های آزمایشگاهی و آمیزش‌های مشاهده شده در سطح مزرعه نیازمند مطرح شدن بحث‌هایی در این زمینه است. تولیدمثل جنسی در *Armillaria* شبیه به بسیاری از بازیدیومیست‌ها، می‌تواند به دو روش قابل پیشروی است: از طریق آمیزش دو هاپلوئید، یا از طریق آمیزش یک دی کاربون (یا دیپلوئید) با یک هوموکاربون هاپلوئید^۱ (پدیده بولر^۲). در آمیزش‌های هاپلوئید - هاپلوئید، هر دو سمت شرکت کننده در آمیزش به شکل 'نر' و 'ماده'، دهنده و گیرنده هسته‌های در حال لقاح هستند. هسته‌های 'نر' حرکت گسترده‌ای در میسیلیوم جنس مخالف داشته و معمولاً این فرایند دو طرفه و متقابل می‌باشد. با این وجود، بر خلاف این که هسته‌ها جابجا

بحث

تیپ‌های DNA میتوکندریایی

تعداد تیپ‌های میتوکندریایی یافت شده در این مطالعه کمتر از تعداد ژنوتیپ‌های شناسایی شده بر مبنای سلیر معیارها بودند: برخی از تیپ‌های mtDNA در بیش از یک ژنوتیپ وجود داشتند. با این وجود در تمامی موارد، ایزوله‌های یک ژنوتیپ یکسان تیپ mtDNA مشابهی داشتند. این الگوی کلی با الگوی مشاهده شده در کار مطالعاتی Smith و همکاران در سال ۱۹۹۰ و همخوانی دارد، به استثنای این که این محققین هیچ گونه تیپ DNA مشترکی در ژنوتیپ‌های مختلف نیافتند، که دلیل احتمالی آن تعداد اندک ژنوتیپ‌های شناسایی شده بود. به علاوه، در بیش از ۴۵ ژنوتیپ گونه *A. gallica*، که ایزوله‌های متعددی از آن‌ها به دست آمده است، تنها یک تیپ mtDNA به ازاء هر ژنوتیپ یافت شد.

موارد مشاهده شده در سطح مزرعه به شکل قابل ملاحظه‌ای با الگوهای مشاهده شده از انتقال mtDNA در آمیزش‌های

¹ haploid homokaryon

² Buller phenomenon

اغلب به تیپ mtDNA یکسانی تعلق دارند با این احتمال که بازیدیوسپورهای *Armillaria* در فواصل نسبتاً کوتاهی انتقال می‌یابند، همخوانی دارد. آزمایش این احتمالات نیازمند انجام تست‌های تعیین‌کننده و گسترده در حوزه تبارشناسی^۵ خواهد بود.

تعریف ژنوتیپ‌ها

در مجموع انگشت‌نگاری به کمک RAPD، با استفاده از سه پرایمر مختلف، موجب تأیید یافته‌های به دست آمده از طریق SI شده است. در موارد نادر، به نظر رسید که انگشت‌نگاری هسته‌ای موجب روشن شدن تغییر بیشتری نسبت به SI شده است، چون با انگشت‌نگاری هسته‌ای سه ژنوتیپ به زیرگروه‌هایی تقسیم شدند. در سه مورد، تعریف ژن‌ها با مشکلاتی همراه است. ما نمی‌توانیم تشخیص دهیم که این زیرگروه‌ها حاصل از آمیزش‌های معجزه‌آسا و بنابراین نشان‌دهنده ژنوتیپ‌های جداگانه هستند، یا این که حاصل موتاسیون سوماتیک یا نوترکیبی میوزی بوده که در آن زیرگروه‌ها قادر به ارائه ژنوتیپ‌های متفاوت نمی‌باشند. ژنوتیپ VE2، که با استفاده از روش SI شناسایی شده، حداقل در شش آلودگی منطقه‌ای غیرمسرری وجود داشت و تنها یک ایزوله متعلق به یک موقعیت مکانی ظاهری متفاوت نسبت به سایر ایزوله‌ها داشت. این نتایج می‌بایست به عنوان یافته‌هایی مقدماتی در نظر گرفته شوند. تعداد پرایمرهای مورد استفاده محدود بود و این احتمال وجود داشت که با پرایمرهای متفاوت نتایج مختلفی حاصل شوند. این احتمال وجود داشت که انتخاب مناسب پرایمرها موجب روشن شدن ناهمگونی ژنتیک در تعداد زیادی از ژنوتیپ‌های سوماتیک شود. با این وجود عقیده داریم که این مورد غیرمحتمل بوده و با کار مطالعاتی Kile در سال ۱۹۸۳ نقاط مشترکی وجود دارد، این محقق بر این باور بود که ژن‌های پراکنده اغلب حاصل از هم‌گسیختن یک ژنوتیپ قدیمی هستند که نسبت به ژنوتیپ‌های ایجاد شده به واسطه درون‌آمیزی گونه‌های هم‌نیا فضای بزرگ‌تری را اشغال می‌کنند.

اگر چه RAPDها قدرت تمایز بیشتری نسبت به ناسازگاری زیستی دارند، اما با استفاده از ال‌های تیپ-آمیزی به عنوان مارکرهای مندلی ثابت شد که این روش توانایی تمایز ناچیزی دارد (تفکیک ۲۱ موجود به جای ۲۳ موجود). مطالعات قبلی

می‌شوند، سیتوپلاسم، همراه با mtDNA حرکتی ندارد. نتیجه این آمیزش یک کلونی دیپلوئید است که حالت موزائیکی از تیپ‌های مختلف mtDNA نشأت گرفته از والد‌های اولیه خود را دارند. بدین ترتیب این سوال مطرح می‌شود که چرا ژنوتیپ‌های موجود به شکل طبیعی فقط دارای یک تیپ mtDNA هستند؟ فرضیه‌های متعددی در این رابطه مطرح شده که ممکن است توجیه‌کننده این تناقض آشکار باشند: (الف) بخش‌هایی از میسلیوم می‌میرند، و سایر قسمت‌های برای کلونیزاسیون^۱ جدید اینوکولوم^۲ تولید می‌کنند، سپس یک تیپ mtDNA به شکل تصادفی حذف می‌شود؛ (ب) یک تیپ می‌تواند مزیت انتخابی برای یک زمینه دیپلوئیدی معین باشد؛ و (پ) در حالت طبیعی، ورودی سیتوپلاسم می‌تواند شکل نامتعادلی داشته باشد؛ یعنی فرایند لقاح میسلیوم‌های هاپلوئید تثبیت شده به وسیله‌هاگی با تیپ mtDNA ضعیف و از بین رفته انجام می‌شود.

در صورتی که در جمعیت‌های طبیعی پدیده مولر نقش اصلی را ایفا کند، توجیه وضعیت آسان‌تر خواهد بود. معمولاً در پدیده بولر این گونه فرض می‌شود که، سیتوپلاسم دیپلوئیدی که به تازگی ایجاد شده به شکل یکطرفه و از سمت میسلیوم هاپلوئید^۳ فراهم می‌شود. این ویژگی می‌تواند توجیه‌کننده عدم تقارن تبدلات هسته‌ای باشد. با این وجود Guillaumon در سال ۱۹۸۶، Korhonen در سال، Rizzo و Harrington در سال ۱۹۹۲، و Anderson، Smith، Carvalho در سال ۱۹۹۵ نشان داده‌اند که در آمیزش‌های آزمایشگاهی بین میسلیوم‌های دیپلوئید-هاپلوئید، هسته‌های میسلیوم دیپلوئید جایگزین هسته‌های هاپلوئید موجود در سیتوپلاسم این سلول‌ها می‌شوند. اگر چنین وضعیتی، در حالت طبیعی رخ دهد، باز هم به ارتباط یک نوع هسته با دو نوع سیتوپلاسم مختلف منتج می‌گردد.

زمانی که ژنوتیپ‌های مختلف تیپ mtDNA یکسانی دارند، یعنی سیتوپلاسم یکسانی را به اشتراک می‌گذارند، می‌تواند بدین معنا باشد که ژنوتیپ‌ها ارتباط نزدیکی با نیای خود دارند. ژنوتیپ‌های با تیپ mtDNA یکسان می‌توانستند به یک خانواده مادرتبار^۴ تعلق داشته باشند. این حقیقت که ژنوتیپ‌های مجاور

¹ colonization

² Inoculum

³ haploid mycelia

⁴ Matrilinear family

⁵ Parentage (پدری یا مادری)

وجود، در تجربه مطالعاتی ما، استفاده از یک روش به عنوان کاری روتین در اپیدمیولوژی، خصوصاً به دلیل مساله تکرارپذیری، مشکل است. علاوه بر این، به نظر نمی‌رسد که روش‌های مبتنی بر ایزوآنزیم‌ها دقیق‌تر از روش ناسازگاری زیستی باشند، چون در کار مطالعاتی Rizzo و Harrington، هیچ یک از ژنوتیپ‌های سوماتیک با استفاده از مارکرهای ایزوآنزیمی به گروه‌های کوچکتر تقسیم نشدند. با این وجود، با یافتن آنزیم‌های پلی مورفیک بیشتر موجب بهبود تفکیک و تمایز ژنتیکی هر یک از گونه‌ها خواهد شد.

نتایج

پایایی آنالیز جمعیت قارچی مبتنی بر دقت روش‌های مورد استفاده در تعریف و تمایز ژنوتیپ‌های تشکیل دهنده این جمعیت است. برای تمایز ژنوتیپ‌های گونه‌های *Armillaria* چهار روش اتخاذ شده است: تست SI، سنجش ال‌های تیپ-آمیزشی، آنالیز ایزوآنزیم و آنالیز DNA هسته ای تصادفی. هر یک از این روش‌ها محدودیت‌هایی دارند. درجه تفکیک ژنوتیپ‌ها به سه عامل بستگی دارد: (الف) تعداد لوکوس‌های بررسی شده، (ب) تعداد ال‌ها در هر لوکوس و فراوانی آن‌ها (پ) میزان تقریب‌های آمیزشی تخصیص داده شده به یک الگوی فضایی خاص. تیپ‌های آمیزشی در هر لوکوس محدودیت بیشتری داشته و کاملاً به هتروزیگوسیتی در دیپلوئیدها محدود می‌شوند. بنابراین ال‌های تیپ - آمیزشی قادر به تمایز ژنوتیپ‌های یک جمعیت محلی، که نسبت به یک جمعیت بزرگ منطقه‌ای درون آمیز هستند، نمی‌باشد. با این وجود، در جمعیت‌های برون آمیز، ال‌های تیپ-آمیزشی، به دلیل تعداد بیشتر ال‌ها در هر لوکوس تیپ آمیزشی، با کارایی بالایی ژنوتیپ‌ها را از یکدیگر تفکیک می‌کنند. در مقابل، آنالیز ایزوآنزیم قادر به سنجش تعداد زیادی از لوکوس‌ها است، اما قدرت تفکیک ژنوتیپ‌ها می‌تواند به واسطه سطوح پائین پلی مورفیسم در این لوکوس‌ها محدود شود. آنالیز RAPD از پتانسیل بررسی تعداد نامحدودی از لوکوس‌ها برخوردار بود. با این وجود، روش بررسی قطعات DNA گمنامی که در این آنالیز نقش دارند، شناخته نشده است. ایراد اصلی این روش نبود پتانسیل تکرارپذیری آن است که، هنگام مقایسه یافته‌ها با دو

نشان داده اند که تست‌های ناسازگاری زیستی و تیپ-آمیزشی قادر به شناسایی موجودات کلونال^۱ یکسانی هستند (Korhonen, 1978; Kile, 1983; Guillaumin & Berthelay, 1990). تنها یک مورد استثنا توسط Kile در سال ۱۹۸۳ عنوان شده است، این محقق گزارشی از یک کلون سوماتیک *A. luteobubalina* را ارائه داد که شامل دو ژنوتیپ دیپلوئید متفاوت از یکدیگر به واسطه یک ال‌های تیپ آمیزشی بود. نتایج به دست آمده از کار مطالعاتی ما بر خلاف گزارش ارائه شده از سوی Kile است، چون در کار مطالعاتی ما نشان داده شد که دو جفت ژنوتیپ تعریف شده به واسطه واکنش‌های سوماتیک (SC3 و SC7؛ SC8 و SC9) ال‌های تیپ آمیزشی یکسانی را به اشتراک می‌گذارند. همچنین در این مورد، احتمالاً دو جفت ژنوتیپ فوق دیپلوئیدهای هم نیایی هستند که حداقل در یکی از لوکوس‌های فرضی مسنول ناسازگاری زیستی ژن‌های متفاوتی دارند. با این وجود، به نظر می‌رسد که واکنش‌های آنتروگونیستی^۲ بین SC5 و SC7 (یا بین SC8 و SC9) ضعیف‌تر از واکنش شایع بین کلون‌های سوماتیک متفاوت بود. این وضعیت 'حدواسط' نشان دهنده وجود تاثیرات بیشتر بین لوکوس‌های متفاوت دخیل در پدیده ناسازگاری *Armillaria* می‌باشد.

در سایر موارد بررسی شده این مطالعه، ژن‌های سوماتیک متفاوت در حداقل سه ال از چهار ال‌های تیپ آمیزشی و اغلب در تمامی ال‌های تیپ آمیزشی با یکدیگر تفاوت داشتند. موردی (بین SC3 و SC9-SC8) یافت شد که در آن تنها دو ال B متفاوت بودند. این شرایط بر عدم وابستگی ناسازگاری زیستی و عوامل تعیین کننده تیپ-آمیزشی تاکید دارد. دو ژنوتیپ فوق احتمالاً ارتباط نزدیکی با یکدیگر نداشتند.

مطالعه ایزوآنزیم‌ها تائیدکننده احتمال یافتن تفاوت‌های بین گونه‌ای (حتی بین ایزوله‌های مجاور) از نظر وجود ایزوآنزیم‌های خاص بود، که این یافته غیرمنتظره ای در رابطه با ارگانیسیم‌های برون آمیز نیست. Rizzo و Harrington در سال ۱۹۹۳، تنها با چهار سیستم آنزیمی، ۱۰ فنوتیپ ایزوآنزیمی^۳ متفاوت مربوط به ۱۱ ژنوتیپ سوماتیک A. را از یکدیگر تفکیک نمودند، که از این بین تنها دو ژنوتیپ الگوی یکسانی را نشان می‌دادند. با این

¹ clonal entities

² antagonistic

³ isozyme phenotypes

نسبت به کل گونه‌ها، و وجود تعداد کمی از عوامل تعیین کننده برای تفکیک در تست SI، توجیه نمود. تحت این شرایط، ژنوتیپ‌های مستقل اغلب فنوتیپ‌های SI یکسانی دارند. این نوع ساختار جمعیتی می‌بایست همیشه به عنوان یک احتمال مدنظر قرار گیرد. با فرض اثبات این که در جمعیت‌های هوموبازیدیومیست برون آمیزی نسبت به درون آمیزی شایع تر است، تست SI همچنان به عنوان ابزاری کارآمد در شناسایی ژنتیک هر یک از گونه‌ها استفاده خواهد شد.

منابع

- [1] Anagnostakis S. The mycelial biology of *Endothia parasitica*. II. Vegetative incompatibility. In: Jennings DH, Rayner ADM, eds. *The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium*. Cambridge University Press, 1983. 499-508.
- [2] Anderson JB, Ullrich RC, Roth LF, Filip GG. Genetic identification of clones of *Armillaria mellea* in coniferous forests in Washington. *Phytopathology*. 1979, 69: 1109-1111.
- [3] Anderson JB, Petsche DM, Smith ML. Restriction fragment polymorphisms in biological species of *Armillaria mellea*. *Mycologia* 1987;79: 69-79.
- [4] Berthelay S, Guillaumin JJ. Contribution a l'etude de la repartition des alleles d' incompatibilite chez un Basidiomycete diploide : *Armillaria obscura* (Secretan) Herink. *Cryptogamie, Mycologie* 1985;6: 185-196.
- [5] Blumenthal KH, Smith EL. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. *Journal of Biological Chemistry* 1973. 248: 6002-6008.
- [6] Brasier CM. Inter-mycelial recognition systems in *Ceratocystis ulmi*: their physiological properties and ecological inheritance. In: Jennings DH, Rayner ADM, eds. *The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium*. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. 451-498.
- [7] Carvalho DB, Smith ML, Anderson JB. Genetic exchange between diploid and h

آنالیز قبلی انجام شده به وسیله بچ‌های متفاوت آنزیم DNA پلیمراز Taq، شرایط بافری متفاوت و سیکل‌های گرمایی مختلف، می‌تواند باعث بروز مشکلاتی گردد. به علاوه، محصولات RAPD شبیه ال‌های غالب رفتار می‌کنند، به طوری که شکل هتروزیگوت به لحاظ فنوتیپی غیرقابل تمایز از فرم هموزیگوت می‌باشد. مشکل بعدی این است که ال 'نول' مغلوب ممکن است منشاء هتروزیگوتی داشته باشد و در این صورت نمی‌توان آن را با نیای ال یکسان فرض کرد.

ناسازگاری سوماتیک ساده ترین و سریع ترین روش است، اما مبنای ژنتیکی آن به‌طور کامل درک نشده است. گونه *Heterobasidion annosum* نخستین بازیدیومیستی است که با مطالعه بر روی آن اطلاعات مربوط به مبنای ژنتیکی SI به دست آمده است (Hansen, Stenlid & Johansson, 1993). از بین دو یا سه لوکوس، حداقل یک مورد شامل وضعیت چند-الی بودند. این سیستم می‌توانست تا اندازه‌ای شبیه به سیستم موجود در گونه‌های جنس *Armillaria* باشد. با این وجود، در نظر نگرفتن مبنای ژنتیکی SI در کار مطالعاتی ما بر روی *Armillaria* مانع از برآورد این احتمال می‌شود که ژنوتیپ‌های با ارتباط نزدیک در برخی از لوکوس‌های مدنظر دارای ال‌های SI متفاوت هستند. در مقایسه با اکتیومیست‌ها، که برخی از گونه‌های آن‌ها از این نظر آنالیز شده اند، وجود همزمان دو نوع هسته متفاوت در سیتوپلاسم هر یک از دو والد باعث پیچیده تر شدن وضعیت می‌شود.

علیرغم وجود این نواقص و کمبودها، اغلب کارهای مطالعاتی مقایسه کننده SI با سایر روش‌های شناسایی ژنوتیپ‌ها، به این نتیجه رسیده اند که بین تمامی این روش‌ها توافق کاملی وجود داشته (Korhonen, 1978; Guillaumin & Berthelay, 1990; Smith et al., 1990, 1994). مواردی تنها تفاوت‌های ناچیزی وجود دارند (Kile; Rizzo & Harrington, 1993) و کار مطالعاتی پیش رو. در جمعیت *Suillus granulatus* توسط Jacobson و همکاران در سال ۱۹۹۳، تست‌های SI با نتایج به دست آمده از RAPDs در گروه بندی ایزوله‌ها همخوانی نداشت. این یافته را می‌توان به سادگی و از طریق نشان دادن وجود سطح بالای درون آمیزی

- aploid mycelia of *Armillaria gallica*. *Mycological Research* 1995 99: 641-647.
- [8] Esser K, Blauch R. 1973. Heterogenic incompatibility in plants and animals. *Advances in Genetics* 7 : 107-152.
- [9] Garbelotto M, Bruns TD, Cobb FW, Orosina WJ. Differentiation of inter sterility groups and geographic provenances among isolates of *Heterobasidion annosum* detected by random amplified polymorphic DNA assays. *Canadian Journal of Botany* 1993. 71: 565- 569.
- [10] Glass NL, Kulda GA. Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology* 1992. 30: 201-224.
- [11] Guillaumin JJ, Contribution à l'étude des Armillaires phytopathogènes, en particulier du groupe *mellea*: cycle caryologique, notion d'espece, rôle biologique des espèces. *Thèse d'Etat, Université Claude Bernard (Lyon 1)*, France. 1986.
- [12] Guillaumin JJ, Berthelay S. Comparaison de deux méthodes d'identification des clones chez le Basidiomycete parasite *Armillaria obscura* (syn. : *A. ostoyae*). *European Journal of Forest Pathology* 1990.20: 257-268 .
- [13] Guillaumin JJ, Berthelay S, Savin V. Etude de la polarité sexuelle des armillaires du groupe *mellea*. *Cryptogamie, Mycologie*, 1983. 4: 301- 319.
- [14] Hansen EM, Stenlid J, Johansson M . Genetic control of somatic incompatibility in the root-rotting basidiomycete *Heterobasidion annosum*. *Mycological Research*. 1993. 97: 1229-1233.
- [15] Hood IA, Sandberg CJ. Occurrence of *Armillaria* rhizomorphs populations in the soil beneath indigenous forests in the Bay of Plenty, New Zealand. *New Zealand Journal of Forestry Science*. 1987. 17: 83-99.
- [16] Jacobson KM, Miller OK, Turner BJ. Randomly amplified polymorphic DNA markers are superior to somatic incompatibility tests for discriminating genotypes in natural populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* .1993. 90 : 9159-9163.
- [17] Karlsson JO, *Genetic structure of populations of root-rot fungi, with special emphasis on Heterobasidion annosum*. Thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Forest Mycology and Pathology, Uppsala, Sweden. 1993.
- [18] Kile GA. Identification of genotypes and the clonal development of *Armillaria luteobubalina* Watling and Kile in eucalypt forests. *Australian Journal of Botany*. 1983.31: 657- 671.
- [19] Kile GA. Genotypes of *Armillaria hinnulea* in wet sclerophyll eucalypt forest in Tasmania. *Transactions of the British Mycological Society*. 1986. 87 : 312- 314.
- [20] Klein-Gebbinck HW, Blenis PV, Hiratsuka Y. Clones of *Armillaria ostoyae* and the pattern of infected juvenile lodgepole pine in Alberta, Canada. *European Journal of Forest Pathology*. 1991. 21 , 5: 260- 266.
- [21] Kohli Y, Brunner LJ, Yoell H, Milgroom MG, Anderson JB, Morrall RAA, Kohn LM. Clonal dispersal and spatial mixing in populations of the plant pathogenic fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Ecology*. 1995.4, 69- 77.
- [22] Korhonen K. Interfertility and clonal size in the *Armillaria mellea* complex. *Karstenia* 18 : 31-42. Legrand Ph, Ghahari S, Guillaumin JJ. 1996. Occurrence of genets of *Armillaria* spp. in four mountain forests of central France: the colonization strategy of *Armillaria ostoyae*. *New Phytologist*. 1978. 133, 321 - 332.
- [23] Leslie JF. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology*. 1993. 33 : 127- 151.
- [24] Marxmüller H, Holdenrieder O, Müller ED. Zur Verbreitung, Phanologie und Ökologie von *Armillaria mellea* s.l. in Südbayern. *Berichte Bayern Botanisches Gesellschaft*. 1990. 61 : 115- 134.
- [25] Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F, Catalan J, Brittan Davidian J. *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines*, Paris, Lavoisier. 1987.
- [26] Perkins D. Main features of vegetative compatibility in *Neurospora*. *Fungal Genetics Newsletter*. 1988. 35 : 44-46.

- [27] Rizzo DM, Harrington TC. Nuclear migration in diploid- haploid pairings of *Armillaria ostoyae*. *Mycologia*. 1992. 84, 6 : 863- 869.
- [28] Rizzo DM, Harrington TC. Delineation and biology of 343 clones of *Armillaria ostoyae*, *A . gemina* and *A. calvescens*. *Mycologia*. 1993.85: 164--174.
- [29] Smith ML, Duchesne LC, Bruhn JN, Anderson JB. 1990. Mitochondrial genetics in a natural population of the plant pathogen *Armillaria*. *Genetics* 126 : 575- 582.
- [30] Smith ML, Bruhn JN, Anderson JB. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature* .1992.356: 428- 431.
- [31] Smith ML, Bruhn JN, Anderson JB. Relatedness and spatial distribution of *Armillaria* genets infecting red pine seedlings. *Phytopathology*.1994. 84: 822- 829.
- [32] Thompson W.. Distribution, development and functioning of mycelial cord systems of decomposer basidiomycetes of the deciduous woodland floor. In: Jennings DH, Rayner ADM, eds. *The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium*. Cambridge: Cambridge University Press, 1984 .185- 214.
- [33] Ullrich RC, Anderson JB. Sex and diploidy in *Armillaria mellea*. *Experimental Mycology* . 1978.2: 119- 129.
- [34] Vilgalys R. Speciation and species concepts in the *Collybia dryophila* complex . *Mycologia* .1991.83, 6: 758- 773.
- [35] Vilgalys R, Cubeta MA. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia* 1994.
- [36] Shengshu An,1 Wenqian Lu,1 Yongfeng Zhang,1 Qingxia Yuan,1 and Di Wang1,2, Pharmacological Basis for Use of *Armillaria mellea* Polysaccharides in Alzheimer's Disease: Antiapoptosis and Antioxidation, Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2017, Article ID 4184562, 11 pages.
- [37] Drakulic J, Gorton C, Perez-Sierra A, Clover G, Beal L. Associations Between *Armillaria* Species and Host Plants in U.K. Gardens. *Plant Dis*. 2017;101: 1903–1909. pmid:30677312
- [38] Kwaśna H, Szykiewicz-Wronek A. Culturable microfungi inhibitory to *Armillaria* rhizomorph formation from *Fagus sylvatica* stump roots and soil. *J Phytopathol*. 2018;166: 314–323.
- [39] Crome MG, Drakulic J, Beal EJ, Waghorn IAG, Perry JN, Clover GRGG. Susceptibility of garden trees and shrubs to *Armillaria* root rot. *Plant Dis*. 2019;104: 483–492. pmid:31746694
- [40] Chen L, Bóka B, Kedves O, Nagy VD, Szűcs A, Champramary S, et al. Towards the Biological Control of Devastating Forest Pathogens from the Genus *Armillaria*. *Forests*. 2019;10: 1013.
- [41] Rees HJ, Bashir N, Drakulic J, Crome MG, Bailey AM, Foster GD. Identification of native endophytic *Trichoderma* spp. for investigation of in vitro antagonism towards *Armillaria mellea* using synthetic- and plant-based substrates. *J Appl Microbiol*. 2021;131: 392–403. pmid:33219581

Variations of Thyroid Peroxidase Levels in Patients with Hyperprolactinemia Caused by Pituitary Adenoma

Ghahari S.*

¹ Department of Biology, Faculty of Biology Science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* (Corresponding author): sghahari3@gmail.com

<https://doi.org/10.30495/jdb.2023.1975728.1347>

Received: December 2022

Accepted: February 2023

Abstract

The purpose of the recent study is to compare SI with three other methods for distinguishing genotypes, which are: DNA fragment polymorphism method resulting from random multiplication (RAPD), investigation of mixed-type alleles and analysis of RAPD isoenzymes and type-type alleles. A mixture of 73 isolates, belonging to 36 genotypes identified based on the analysis, were used. A limited number of isolates were investigated using isozyme polymorphism. RAPDs, mixed-type alleles and SI in all three cases of isolates differentiated through SI reactions included two subgroups with different RAPD phenotypes. In two cases, the groups differentiated through SI reactions shared a similar set of alleles of the mixing type. Isoenzyme analysis showed interspecies differences and insignificant differences between genotypes of the same species. These findings have led to consider the use of SI as a routine and valid method for epidemiological studies of *Armillaria* species. In the same group of isolates, profiles of the EcoR I fragment related to mitochondrial DNA were also investigated. This analysis regrouped the genotypes into 'mitochondrial types' that share common cytoplasm and are likely closely related through sexual reproduction.

Keywords: RFLP, RAPD, Species of the genus *Armillaris*, type-mixing alleles.