

## بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pythium aphanidermatum* Fitzp عامل مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندر قند با استفاده از نشانگر تکثیر بین توالی تکراری ساده (ISSR)

معصومه امینی<sup>۱</sup>، ناصر صفایی<sup>۲\*</sup>، سید باقر محمودی<sup>۳</sup>

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

۳- استادیار موسسه تحقیقات چغندر قند

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Nsaifae@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۳)

### چکیده

بیماری پوسیدگی ریشه چغندر قند ناشی از قارچ *Pythium aphanidermatum* Fitzp، یکی از مهمترین بیماری‌های چغندر قند در ایران می‌باشد. جهت بررسی تنوع ژنتیکی عامل این بیماری، از مزارع چغندر کاری هشت استان کشور به تعداد ۱۰ تا ۲۰ نمونه از هر مزرعه، نمونه برداری شد. جدایه‌ها پس از خالص سازی، براساس خصوصیات ریخت‌شناسی اندام‌های رویشی و زایشی، شناسایی و ۱۹ جدایه برای بررسی تنوع ژنتیکی انتخاب شدند. مطالعات مولکولی جدایه‌ها براساس نشانگر ISSR و با هشت آغازگر انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه تحلیل خوشه‌ای آغازگرها بر اساس روش UPGMA و ضریب جاکارد، در سطح مشابه ۶۴ درصد جدایه‌ها را به پنج گروه تقسیم کرد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل سرعت رشد جدایه‌ها در دو دمای  $29 \pm 2^\circ\text{C}$  و  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ، توسط نرم افزار MVSP و MSTATC، جدایه‌ها را به دو گروه تند رشد و کند رشد تقسیم کرد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مولکولی و مورفولوژیکی نشان داد که جدایه‌های متعلق به این هشت ناحیه جغرافیایی، دارای قرابت ژنتیکی بوده و لزوماً ارتباطی بین سرعت رشد جدایه‌ها و پراکنش جغرافیایی آنها وجود ندارد.

### واژه‌های کلیدی

پوسیدگی ریشه چغندر قند،

تنوع ژنتیکی،

صفات مورفولوژیکی،

نشانگر ISSR

*Pythium aphanidermatum* Fitzp

### مقدمه

یکی از مهمترین عوامل کاهش عملکرد چغندر قند پوسیدگی پی‌تیومی ریشه چغندر قند می‌باشد. جنس *Pythium*، پاتوژن بذور، گیاهچه‌ها و بافت‌های گیاهی نابالغ می‌باشد. همچنین تعدادی از گونه‌های این جنس به بافت‌های گیاهی بالغ حمله کرده و در آنها باعث بیماری می‌شوند. بیماری پوسیدگی پی‌تیومی ریشه ایجاد شده توسط *Pythium aphanidermatum* Fitzp در ایالت‌های آریزونا، کالیفرنیا، کلرادو، تگزاس، کانادا، استرالیا و ایران گزارش شده است و پوسیدگی پی‌تیومی ریشه ایجاد شده توسط *P. deliense* Meurs نیز با علائم متفاوتی در آریزونا و تگزاس گزارش شده است (Rush 1987). شناسایی دقیق گونه‌ها و جمعیت‌های درون گونه‌ای بیمارگرها، اولین گام جهت کنترل موثر آنها می‌باشد. به دلیل عدم وجود صفات مورفولوژیکی تشخیصی و تغییرپذیری ساختارهای مورفولوژیکی در جنس *Pythium* همانند دیگر جنس‌های Oomycetes، استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی در شناسایی اعضای داخل

بیماریا در مزارع چغندرقد، *P. aphanidermatum* از بیشترین پراکندگی برخوردار است (Sheikholeslami et al. 2002). همچنین ثابت شده است که در مزارع چغندرقد شمال غرب ایران *P. aphanidermatum*، *P. ultimum* var. *ultimum* و *Pythium* group HS بیماریزای بسیار بالایی روی ریشه‌های چغندرقد دارند (Babai-Ahary et al. 2004).

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از مزارع مختلف چغندرقد استان‌های آذربایجان غربی، خراسان، فارس، تهران، کرمانشاه، لرستان، مرکزی و همدان در طول فصل زراعی و با بازرسی از مزارع انجام شد. نمونه‌برداری به تعداد ۱۰ تا ۲۰ نمونه از هر مزرعه بسته به وسعت آن انجام شد.

#### جداسازی

ریشه‌ها و گیاهچه‌های چغندرقد دارای علائم پوسیدگی به مدت ۲۰ دقیقه با آب شستشو داده شد. سپس به مدت ۲۰ ثانیه با الکل اتیلیک ۷۰ درصد ضدعفونی و پس از دو بار شستشو با آب مقطر استریل روی کاغذ صافی آگیری شد. از نمونه‌های ضدعفونی شده قطعات نیم تا یک سانتیمتری از فواصل بین بافت آلوده و سالم جدا شده و در محیط کشت CMA [عصاره‌ی ۶۰g دانه ذرت، ۲۰۰ mg کلرامفنیکل، ۱۶ g آگار و یک لیتر آب مقطر] کشت شدند. پرگنه‌های بدست آمده پس از تقریباً ۲۴ تا ۴۸ ساعت روی محیط کشت آب آگار دو درصد کشت و به روش نوک ریشه خالص شدند (Singelton et al. 1990). برای جداسازی *P. aphanidermatum* از خاک نیز از دو روش طعمه‌گذاری با بذر چغندرقد و دیگری کشت بذر چغندرقد در خاک آلوده و جداسازی قارچ از گیاهچه‌های آلوده به روش بالا انجام گرفت (Van der Plaats- Niterink Singelton et al. 1990) (1982).

#### خالص‌سازی و شناسایی

برای تهیه قارچ خالص از جدایه‌ها از روش کشت نوک ریشه استفاده شد (Islam et al. 2004; Lamour and Hausbeck 2001; Lamour and Hausbeck 2000). شناسایی جدایه‌ها بر اساس

گونه‌ها بسیار مشکل است (Levesque and de Cock 2004; Martin 2000). استفاده از تکنیک‌های مولکولی می‌تواند به حل این مشکل کمک کند. از جمله تکنیک‌های مولکولی که جهت شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. aphanidermatum* استفاده شده عبارتند از: AFLP، RAPD، ALP، RFLP، SSR، Chen, 1992; Francis et al. PCR-RFLP، ITS، SCAR، ISSR 1994; Herrero and Klemsdal 1998; Kageyama et al. 1998; Matsumoto et al. 2000; Harvey et al. 2000; Garzon et al. 2005; Youssuf et al. 2005; Vasserur et al. 2005; Al-Sadi 2007; Garzon et al. 2007; Al-Sadi et al. 2008; Lee and (Moorman 2008). از سال ۱۹۹۴، نشانگر (Inter-simple sequence repeat amplification) در مطالعات ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت (Zietkiewicz et al. 1994). در این نشانگر، از آغازگرهای SSR تغییر یافته با ردیف‌های غیر تکرار شونده به صورت قلاب شده در انتهای ۳ یا انتهای ۵ استفاده می‌کنند. ناحیه قلاب شده آغازگر، اجازه اتصال محکم‌تر آغازگر به جایگاه هدف را می‌دهد. استفاده از این نشانگر بسیار سریع و آسان است و به نظر می‌رسد که به دلیل طویل بودن آغازگرها، قابلیت تکثیر نشانگر SSR را نیز داشته باشد (Zietkiewicz et al. 1994; Tsmmura et al. 1996; Nagaoka and Ogihara 1997). این نشانگر به دلیل فراوانی مناطق تکرار شونده در ژنوم، چندشکلی بیشتری را نسبت به آغازگرهای RAPD نشان داده و باندهای حاصل اطلاعات بیشتری را از ژنوم می‌دهد (Esselman et al. 1999). بر اساس مطالعات روی گونه‌های گروه F پی‌تیوم با استفاده از این نشانگر مشخص شد که در ژنوم گونه‌های این گروه موتیف‌های تکراری وجود دارد و ثابت شده که نشانگر ISSR توانایی تمایز بالایی را در تجزیه‌های مربوط به مطالعه میکوریزها و پاتوژن‌ها دارد (Vasserur et al. 2005). پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه چغندرقد سال‌ها در استان‌های مختلف ایران دیده می‌شود و از آنجا که کشت چغندرقد در کشور حائز اهمیت می‌باشد، لذا داشتن اطلاع دقیق از نقش و اهمیت گونه‌های *Pythium* به عنوان عامل مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندرقد مهم می‌باشد. دو گونه *P. aphanidermatum* و *P. deliense* در استانهای خوزستان و خراسان به ترتیب گونه‌های بیماریزای غالب هستند (Afzali and Ershad 2006; Zamani Noor et al. 2004). در استان کرمانشاه نیز، در بین قارچ‌های

زیر نور فلورسانت نگهداری شدند. اسپوران‌ها به فاصله یک تا سه روز بعد تشکیل شده و مورد بررسی قرار گرفت.

کلیدها و ویژگی‌های مورفولوژیکی (Van der Plaats- Niterink 1982) انجام شد (جدول ۱). برای تولید اندام‌های رویشی و زایشی سه قرص پنج میلی متری از هر جدایه در آب مقطر دو بار استریل شده‌ی حاوی بذور شاهدانه جوشانده شده قرار داده و در

جدول ۱- مشخصات ۱۹ جدایه انتخاب شده بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی از گونه *P. aphanidermatum* و یک جدایه *P. deliense*

| علائم بیماری | محل جمع‌آوری   | منشا | تاریخ جمع‌آوری (سال ۸۶) | شکل پایه اووگونی   | نام گونه                 | نام جدایه |
|--------------|----------------|------|-------------------------|--------------------|--------------------------|-----------|
| پوسیدگی ریشه | آذربایجان غربی | ریشه | تبر                     | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 8D        |
| پوسیدگی ریشه | آذربایجان غربی | ریشه | تبر                     | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 24D       |
| مرگ گیاهچه   | فارس           | خاک  | اردیبهشت                | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 26A       |
| پوسیدگی ریشه | کرمانشاه       | ریشه | آبان                    | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 17D       |
| پوسیدگی ریشه | لرستان         | ریشه | تبر                     | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 10D       |
| مرگ گیاهچه   | فارس           | خاک  | اردیبهشت                | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 19A       |
| پوسیدگی ریشه | همدان          | ریشه | تبر                     | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 16D       |
| مرگ گیاهچه   | فارس           | خاک  | اردیبهشت                | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 19B       |
| پوسیدگی ریشه | تهران          | ریشه | مهر                     | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 7D        |
| پوسیدگی ریشه | کرمانشاه       | ریشه | تبر                     | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 22D       |
| پوسیدگی ریشه | لرستان         | ریشه | آبان                    | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 11D       |
| پوسیدگی ریشه | مرکزی          | ریشه | مهر                     | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 15D       |
| پوسیدگی ریشه | لرستان         | ریشه | آبان                    | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 23D       |
| پوسیدگی ریشه | مرکزی          | ریشه | مرداد                   | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 12D       |
| پوسیدگی ریشه | لرستان         | ریشه | تبر                     | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 21D       |
| پوسیدگی ریشه | آذربایجان غربی | ریشه | مهر                     | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 19D       |
| پوسیدگی ریشه | لرستان         | ریشه | آبان                    | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 14D       |
| پوسیدگی ریشه | خراسان         | ریشه | مرداد                   | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 18D       |
| پوسیدگی ریشه | خراسان         | ریشه | مرداد                   | پایه اووگونی خمیده | <i>P. deliense</i>       | 5D        |
| پوسیدگی ریشه | کرمانشاه       | ریشه | آبان                    | پایه اووگونی راست  | <i>P. aphanidermatum</i> | 13D       |

اندازه‌گیری سرعت رشد

قطر دو سانتی‌متر، توده میسلیم‌ها با آب مقطر سترون شستشو و آبگیری شده و بلافاصله در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شدند (Matsumoto et al. 2000).

#### استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از روش صفایی و همکاران (روش کاربرد محلول نمکی DNA) استفاده شد (Safaie et al. 2005). اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه بیوفومتر و الکتروفورز نمونه‌های استخراج شده در ژل آگاروز ۰/۸ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت.

اندازه‌گیری سرعت رشد جدایه‌ها در دو دمای  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  و  $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ، با چهار تکرار، انجام شد. قطر کلنی‌های تشکیل شده بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت از کشت اندازه‌گیری و ثبت شد.

#### مطالعات مولکولی

تهیه توده میسلیم

جهت تهیه توده میسلیم، حدود سه قرص از حاشیه فعال کشت دو روزه جدایه‌ها به فلاسک‌های حاوی ۵۰ ml از محیط کشت مایع (عصاره‌ی ۲۰۰ g سیب زمینی و ۱۵ mg دکستروز) منتقل و در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  به مدت چهار تا هفت روز روی شیکر در ۱۱۰ rpm نگهداری شدند. بعد از تشکیل توده‌های میسلیمی به

جدول ۲- توالی آغازگرهای ISSR استفاده شده در این مطالعه

| آغازگر              | توالی                         | منبع                         | دمای اتصال (°C) |
|---------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------|
| (TGTC) <sub>5</sub> | 5'-TGCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTC-3' | (Xue et al. 2006)            | ۵۸              |
| P1                  | 5'-TCTCTCTCTCTCTCTCC-3'       | (Stepansky et al. 1999)      | ۵۲              |
| P4                  | 5'-CTGGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'   | (Borner and Branchard, 2004) | ۵۴              |
| ISSR02              | 5'-ACTGACTGACTGACG-3'         | (Sharma et al. 2005)         | ۵۳              |
| LB-A                | 5'-(GACA) <sub>4</sub> TA-3'  | (Arbaoui et al. 2008)        | ۵۲              |
| LB-B                | 5'-(GACA) <sub>4</sub> TT-3'  | (Arbaoui et al. 2008)        | ۴۸              |
| LB-C                | 5'-(GACA) <sub>4</sub> GT-3'  | (Arbaoui et al. 2008)        | ۴۸              |
| PcMs                | 5'-(GTC) <sub>7</sub> -3'     | (Arbaoui et al. 2008)        | ۶۷              |

برای بدست آوردن ماتریس شباهت بین جدایه‌ها، وجود و عدم وجود هر یک از باندها به صورت اعداد صفر و یک تعیین شد. بر اساس نتیجه ماتریس شباهت که با استفاده از ضریب تشابه جاکارد بدست آمده بود و تجزیه و تحلیل خوشه‌ای به کمک روش UPGMA در نرم افزار MVSP، دندروگرام مربوط به مجموع آغازگرها رسم شد.

### نتایج و بحث

شناسایی گونه *P. aphanidermatum* در شناسایی مورفولوژیکی گونه براساس شکل پرگنه و تولید ریشه‌های هوایی در محیط کشت CMA و شکل اسپورانژها، ۲۰ جدایه شناسایی شد که در شناسایی مولکولی توسط جفت آغازگر نیمه اختصاصی Pa1/ITS2 نیز در این ۲۰ جدایه یک قطعه ۲۱۰ جفت بازی تکثیر شد (شکل ۱ و ۲). جدایه‌های گونه *P. aphanidermatum* از لحاظ ویژگی‌های مورفولوژیکی به قدری با هم شباهت دارند که تمایز و بررسی آنها از روی صفات مورفولوژیکی بسیار مشکل می‌باشد. نه تنها جدایه‌های گونه *P. aphanidermatum* بلکه حتی دو گونه *P. aphanidermatum* و *P. deliense* نیز از لحاظ بسیاری از صفات مورفولوژیکی مشابه هم می‌باشند طوری که بعضی از محققین این دو گونه را یکی تلقی می‌کنند. از آنجا که این آغازگر نیمه اختصاصی، قادر به تفکیک این دو گونه نبود لذا جهت تفکیک جدایه‌ها از این لحاظ،

شناسایی *P. aphanidermatum* با استفاده از آغازگر نیمه اختصاصی

به منظور شناسایی مستقیم جدایه‌ها، از یک جفت آغازگر نیمه اختصاصی (Pa1:5'-CCACGTGAACCGTTGAAATC-3')، ITS2: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') استفاده شد (Wang et al. 2003). واکنش PCR در مخلوط واکنش ۲۰ میکرولیتری حاوی ۲ μl از 50 mM KCL, 10 mM PCR Buffer از ۲ μM Tris-HCL, pH 9.0، ۲ mM MgCl<sub>2</sub>، ۱۰۰ μM از هر یک از dNTPها، ۰/۴ μM از هر یک از آغازگرهای Pa1 و ITS2، ۲۰ ng از DNA نمونه و ۲ واحد آنزیم Taq polymerase در ترموسایکلر اپندروف گرادینت انجام شد. تکثیر قطعات DNA، با واسرشته‌سازی اولیه DNA ژنومی در دمای ۹۴ °C به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه شامل ۹۴ °C به مدت یک دقیقه، ۶۷ °C به مدت دو دقیقه، ۷۲ °C به مدت دو دقیقه و ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصولات PCR به همراه نشانگر نردبان ژنومی ۱۰۰ bp روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد به مدت یک ساعت الکتروفورز شد.

### نشانگر ISSR

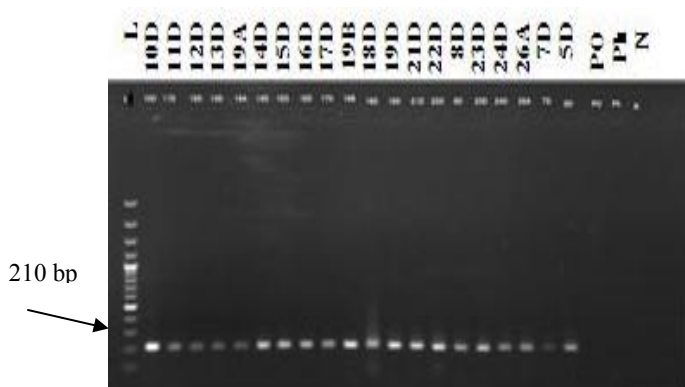
جهت بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها، ۱۸ آغازگر ISSR مورد مطالعه قرار گرفتند که از میان آنها تعداد هشت آغازگر تکرارپذیری و چند شکلی بیشتری را نشان دادند لذا برای کلیه جدایه‌ها استفاده شدند (جدول ۲). واکنش PCR با استفاده از این آغازگرها در مخلوط واکنشی ۲۵ میکرولیتری حاوی ۲/۵ μL از PCR Buffer، ۱/۵ mM MgCl<sub>2</sub>، ۲۰۰ μM از هر یک از dNTPها، ۰/۴ μM از هر یک از آغازگرهای ISSR، ۱۵ ng از DNA نمونه و ۲/۵ واحد آنزیم Taq polymerase در ترموسایکلر اپندروف گرادینت و طبق برنامه‌های تکثیر ذکر شده در جدول ۳ انجام گرفت

ارزیابی محصولات PCR با الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد در بافر 1X TBA (تریس بازی ۱۰/۸ g/lit، اسیدبوریک ۵/۵ g/lit، EDTA نیم مولار ۴ ml/lit) و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. برای تخمین اندازه قطعات تکثیر شده طی واکنش PCR، از نشانگریک kb استفاده شد (شکل ۳).

جدول ۳- چرخه‌های دمایی واکنش PCR، آغازگرهای مربوط به نشانگر ISSR

| آغازگر 5 (TGTC) |                        |              | آغازگرهای LB-A ، LB-B و LB-C |                        |              |
|-----------------|------------------------|--------------|------------------------------|------------------------|--------------|
| مدت زمان        | درجه حرارت             | مراحل        | مدت زمان                     | درجه حرارت             | مراحل        |
| ۵ دقیقه         | ۹۵°C                   | واسرشت اولیه | ۲ دقیقه                      | ۹۴°C                   | واسرشت اولیه |
| ۲۰ ثانیه        | { ۹۴°C<br>۵۸°C<br>۷۲°C | واسرشت سازی  | ۱ دقیقه                      | { ۹۴°C<br>۵۳°C<br>۷۲°C | واسرشت سازی  |
| ۱ دقیقه         |                        | ۴۰ چرخه      | ۱ دقیقه                      |                        | اتصال        |
| ۲۰ ثانیه        |                        | گسترش اولیه  | ۵ دقیقه                      |                        | گسترش اولیه  |
| ۶ دقیقه         | ۷۲°C                   | گسترش نهایی  | ۱۰ دقیقه                     | ۷۲°C                   | گسترش نهایی  |
| آغازگر PcMs     |                        |              | آغازگرهای P4 ، P1 و ISSR02   |                        |              |
| مدت زمان        | درجه حرارت             | مراحل        | مدت زمان                     | درجه حرارت             | مراحل        |
| ۵ دقیقه         | ۹۴°C                   | واسرشت اولیه | ۵ دقیقه                      | ۹۵°C                   | واسرشت اولیه |
| ۲ دقیقه         | ۶۸°C                   | اتصال اولیه  | ۴۵ ثانیه                     | ۴۵°C                   | اتصال اولیه  |
| ۲ دقیقه         | ۷۰°C                   | گسترش اولیه  | ۱ دقیقه                      | ۷۲°C                   | گسترش اولیه  |
| ۱ دقیقه         | { ۹۴°C<br>۶۸°C<br>۷۰°C | واسرشت سازی  | ۱ دقیقه                      | { ۹۵°C<br>۴۵°C<br>۷۲°C | واسرشت سازی  |
| ۱ دقیقه         |                        | ۴۴ چرخه      | ۴۵ ثانیه                     |                        | اتصال        |
| ۲ دقیقه         |                        | گسترش        | ۱ دقیقه                      |                        | گسترش        |
| ۱۰ دقیقه        | ۷۰°C                   | گسترش نهایی  | ۱۰ دقیقه                     | ۷۰°C                   | گسترش نهایی  |

تجزیه و تحلیل داده‌ها در دو دما، با نرم‌افزار MSTATC و MVSP، جدایه‌ها را در فاصله اقلیدوسی ۲/۴ به دو گروه مجزای کند رشد I (۴۲ درصد جدایه‌ها) و تند رشد II (۵۸ درصد جدایه‌ها) تقسیم بندی کرد (شکل ۳). سرعت رشد جدایه‌های کند

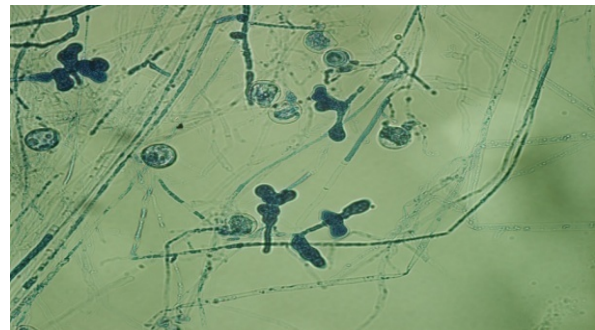


شکل ۱- الگوی بانندی بدست آمده از جدایه‌های *P. aphanidermatum* با استفاده از جفت آغازگر Pa1/ITS2؛ L: نشانگر نردبان ژنومی ۱۰۰ bp، چاهکهای 10D تا 7D مربوط به جدایه‌های *P. aphanidermatum* می‌باشند که مشخصات آنها به طور کامل در جدول ۱ آورده شده است، 5D: گونه *P. deliense*، PO: *P. oliganderum*، Ph: *Phytophthora*، N: کنترل منفی

از ویژگی‌های مورفولوژیکی استفاده شد و براساس خمیده یاراست بودن پایه اووگونی همه جدایه‌ها به جز یک جدایه، *P. aphanidermatum* تشخیص داده شد (شکل ۲) و یک جدایه هم به عنوان *P. deliense* شناسایی شد که مربوط به استان خراسان بود و قبلاً نیز این گونه از چغندر قند از استان خراسان جدا و معرفی شده بود (Afzali and Ershad 2006). گونه *P. aphanidermatum* دارای پایه اووگونی راست و گونه *P. deliense* دارای پایه اووگونی خمیده می‌باشد. با توجه به این نتایج مشخص شد که در این مطالعه، روش مولکولی خود به تنهایی قادر به تفکیک دو گونه‌ی بسیار نزدیک به هم نیست در حالیکه با استفاده از روش مورفولوژیکی می‌توان این دو گونه را از هم تفکیک کرد. از طرفی هم استفاده از روش‌های مورفولوژیکی در شناسایی گونه‌ها و جدایه‌ها، به دلیل تغییرپذیری ساختارهای مورفولوژیکی این جنس، بسیار مشکل و زمان‌بر می‌باشد و نباید صرفاً به مطالعات مورفولوژیکی بسنده کرد. لذا استفاده از روش مولکولی جهت شناسایی جدایه‌ها، زمانی راحت‌تر و سریع‌تر خواهد بود که یک آغازگر کاملاً اختصاصی برای شناسایی گونه‌ی مورد نظر وجود داشته باشد.

بین جدایه‌های تند رشد و کند رشد آشکار نکرد. لذا هیچ ارتباطی بین پراکنش جغرافیایی و نیز میزان سرعت رشد جدایه‌ها بر اساس مطالعات مولکولی یافت نشد.

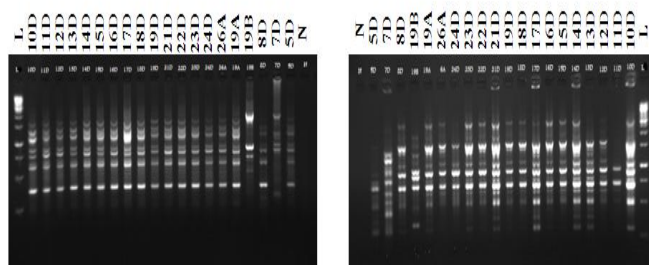
در سال‌های اخیر با پیشرفت تکنولوژی مولکولی و امکان مطالعه دقیق تنوع ژنومی در میکروارگانیسم‌ها، ابزار لازم برای شناسایی تنوع ژنتیکی درون افراد یک گونه به خوبی فراهم شده‌است. قارچ *P. aphanidermatum* عامل بیماری پوسیدگی پی‌تیومی به علت اهمیتی که دارد در اکثر نقاط دنیا موضوع تحقیقات مختلف بر اساس نشانگرهای مولکولی بوده‌است. بررسی نواحی ISSR روشی است که به سرعت تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های یک گونه را نشان می‌دهد. از این نشانگر در مطالعه تنوع ژنتیکی پاتوژن‌های



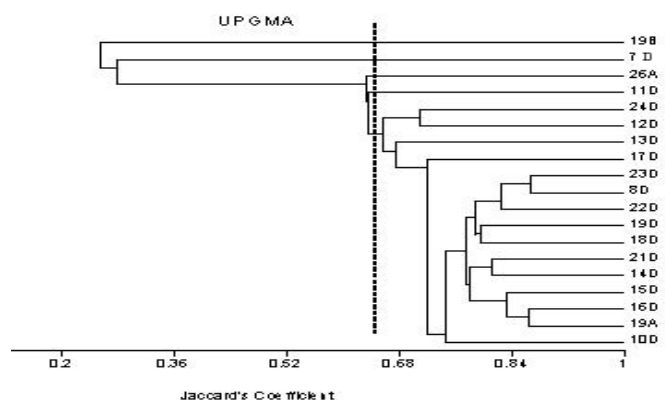
شکل ۲- مورفولوژی اسپورانژیوم و اووگونی قارچ *P. aphanidermatum*

سرعت رشد جدایه‌ها

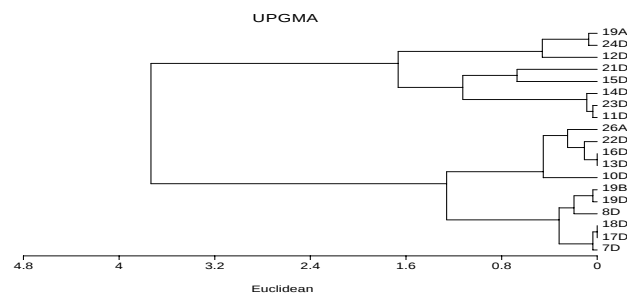
رشد به طور متوسط ۲/۳۱ و ۱/۸ سانتیمتر در روز و سرعت رشد جدایه‌های تند رشد نیز ۴/۹۳ و ۵ سانتیمتر در روز به ترتیب در دمای  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  و  $29 \pm 2^\circ\text{C}$  بود. در این مطالعه ارتباطی بین سرعت رشد جدایه‌ها و پراکنش جغرافیایی آنها مشاهده نشد.



شکل ۴- الگوی باندهای DNA تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای به ترتیب از چپ به راست ISSR02 و LB-A با نشانگر مولکولی ISSR، در ۱۹ جدایه *P. aphanidermatum*: چاهکهای ۱۰D تا ۷D مربوط به جدایه‌های *P. aphanidermatum* می‌باشند که مشخصات آنها به طور کامل در جدول ۱ آورده شده است، ۵D: گونه *P. deliense*، L: نشانگر نردبان ژنومی ۱Kb N: کنترل منفی



شکل ۵- گروه‌بندی حاصل از تنوع ژنتیکی ۱۹ جدایه *P. aphanidermatum* با استفاده از هشت آغازگر ISSR



شکل ۳- گروه‌بندی ۱۹ جدایه *P. aphanidermatum* بر اساس سرعت رشد در دو دمای  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  و  $29 \pm 2^\circ\text{C}$

تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. aphanidermatum* بر اساس نشانگر ISSR

نتایج حاصل از تلفیق هشت آغازگر و تجزیه خوشه‌ای آنها بر اساس ضریب تشابه جاکارد نشان داد که در سطح تشابه ۶۴ درصد جدایه‌ها به پنج گروه تقسیم شدند (شکل ۴ و ۵). گروه اول شامل یک جدایه از فارس، گروه دوم شامل یک جدایه از تهران، گروه سوم شامل یک جدایه از فارس، گروه چهارم شامل یک جدایه از استان لرستان و گروه پنجم با درصد فراوانی ۷۸/۹۴ درصد شامل جدایه‌هایی از آذربایجان غربی، خراسان، فارس، کرمانشاه، لرستان، مرکزی و همدان بود. در این مطالعه با اینکه جدایه‌ها از لحاظ سرعت رشد در دو گروه کاملاً مجزا قرار گرفتند ولی دارای شباهت‌های مولکولی بسیار نزدیکی بودند طوری که بررسی مولکولی با این نشانگر، هیچگونه تمایزی را

نشان دادند (Garzon et al. 2005). در کل می‌توان نتیجه گرفت که گونه *P. aphanidermatum* از کمترین تنوع درون گونه‌ای برخوردار است.

## منابع

- Afzali H, Ershad D (2006) The causal agents of root rot and damping-off sugar beet in Khorasan province and relation of plant age and *Pythium* spp. 17<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, 2-5 Sept.
- Al-Sadi AM, Drenth A, Deadman M L, Aitken AB (2008) Genetic diversity, aggressiveness and metalaxyl sensitivity of *Pythium aphanidermatum* populations infecting cucumber in oman. Plant pathology, 56: 140-149.
- Al-Sadi AM (2007) Population diversity, sources and evaluation of metalaxyl-based management of *Pythium* damping-off of cucumber in oman. Plant pathology 57: 45-56.
- Arbaoui A, Kraic J, Huszar J (2008) Genetic variation of *Sclerotinia Sclerotiorum* isolates form different conditions. Agriculture 54(1): 36-39.
- Babai-Ahary A, Abrinnia M, Majidi Heravan I (2004) Identification and pathogenicity of *Pythium* species causing damping-off in sugarbeet in northwest Iran. Australasian Plant Pathology, 33: 343-347.
- Bornet B, Branchard M (2004) Using of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity in several related *Brassica* taxa and *Arabidopsis thaliana*. Hereditas 140: 245-248.
- Chen W (1992) Restriction fragment length polymorphisms in enzymically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Pythium* species. Phytopathology 82(12): 1467-1472.
- Esselman EJ, Jianqiang L, Crawford D J, Winduss JL, Wolfe AD (1999) Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. Molecular Ecology 8:443-451.
- Francis DM, Gehlen MF, Clair DA (1994) Genetic variation in homothallic and hyphal swelling isolates of *Pythium ultimum* var. *ultimum* and *P. ultimum* var. *sporangiferum*. Molecular Plant Microbe Interact, 7(6): 766-775.
- Garzon CD, Yanez JM, Moorman GW (2007) *Pythium cryptoirregular*, a new species within the *P. irregulare* complex. Mycologia 99(2): 291-301.
- Garzon CD, Geiser DM, Moormam GW (2005) Diagnosis and population analysis of *Pythium* species using AFLP fingerprinting. Pennsylvania State University, University Park 16802, USA.
- Harvey PR, Butterworth PJ, Hawke BG, Pankhurst CE (2000) Genetic variation among populations of *Pythium irregulare* in southern Australia. Plant Pathology 49: 619-627.

زیادی از جمله فوزاریوم (Ratnaparkhe et al. 1998) و غیره استفاده شده‌است. در این مطالعه بر اساس تجزیه و تحلیل باندهای حاصل از هشت آغازگر ISSR، چهار جدایه هر کدام در گروه‌های مجزا و ۱۵ جدایه نیز در یک گروه قرار گرفتند که شامل هر دو جدایه‌های تند رشد و کند رشد بود. این نتایج نشان دهنده شباهت ژنتیکی بسیار زیاد بین این جدایه‌ها می‌باشد و در واقع نشان می‌دهد که گونه *P. aphanidermatum* از کمترین تنوع درون گونه‌ای برخوردار است. همچنین نمی‌توان بر اساس این نشانگر مولکولی جدایه‌های تند رشد را از جدایه‌های کند رشد متمایز کرد. در این مطالعه نه تنها جدایه‌ها مشابه هم بودند بلکه قرابت بسیار نزدیکی با گونه *P. deliense* داشتند به طوری که نشانگر ISSR قادر به تفکیک این دو گونه از یکدیگر نشد. چنین نتیجه‌ای، در مطالعه دیگری نیز بدست آمد (Youssuf et al. 2005). همچنین بر اساس این مطالعه مشخص شد که دو گونه *P. aphanidermatum* و *P. deliense* از نظر دمای رشد مشابه می‌باشند. نتایج حاصل از گروه‌بندی مولکولی، ارتباطی بین جدایه‌ها و نواحی جغرافیایی و همچنین سرعت رشد آنها نشان نداد. نکته قابل توجه در این تجزیه و تحلیل‌های مولکولی این بود که همه آغازگرهای ISSR استفاده شده در این تحقیق به استثناء آغازگر LB-B، دو جدایه 7D و 19B به ترتیب مربوط به استان تهران و فارس را از دیگر جدایه‌ها مجزا کرده و در گروه‌های جداگانه‌ای قرار دادند. طی یک تحقیقی روی *P. aphanidermatum* در عمان، با استفاده از نشانگر AFLP مشخص شد که جدایه‌های *P. aphanidermatum* مربوط به عمان و دیگر مناطق شباهت ژنتیکی بسیار بالایی (۹۴ درصد) دارند (Al-Sadi et al. 2008). همچنین بر اساس مطالعه روی نواحی ITS نیز مشاهده شد که گونه *P. aphanidermatum* کمترین تنوع درون گونه‌ای را در توالی‌های ITS دارا می‌باشد (Al-Sadi 2007). همچنین با مطالعه‌ای که روی سه گونه *P. aphanidermatum*، *P. ultimum* و *P. irregulare* با استفاده از انگشت نگار AFLP انجام شد، مشخص شد که در *P. aphanidermatum* بین جدایه‌ها کمترین فاصله ژنتیکی (۱۵ درصد) وجود دارد و بعد از آن هم جدایه‌های *P. ultimum* با فاصله ژنتیکی ۳۷ درصد بودند. جدایه‌های *P. irregulare* بیشترین فاصله ژنتیکی (۶۴ درصد) را

- Herrero ML, Klemsdal SS (1998) Identification of *Pythium aphanidermatum* using the RAPD technique. Mycology Research 102:136-140.
- Islam SZ, Babadoost M, Lambert KN, Ndeme A, Fouly, HM (2004) Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from processing pumpkin in Illinois. Plant disease 89: 191-197.
- Kageyama K, Uchino H, Hyakumachi M (1998) Characterization of the hyphal swelling group of *Pythium*: DNA polymorphisms and cultural and morphological characteristics. Plant Disease 82: 218-222.
- Lamour KH, Hausbeck MK (2001) Investigating the spatiotemporal genetic structure of *Phytophthora capsici* in Michigan. Phytopathology, 91: 973-980.
- Lamour KH, Hausbeck MK (2000) Mefenoxam insensitivity and sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. Phytopathology 90: 396-400.
- Lee S, Moorman GW (2008) Identification and characterization of simple sequence repeat markers for *Pythium aphanidermatum*, *P. cryptoirregulare* and *P. irregulare* and the potential use in *Pythium* population genetics. Current Genetics, 53(2): 81-93.
- Levesque CA, de Cock Awam (2004) Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. Mycology Research, 108: 1363-1383.
- Martin FN (2000) phylogenetic relationships among some *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially encoded cytochrome oxidase II gene. Mycologia, 92: 711-727.
- Matsumoto C, Kageyama K, Suga H, Hyakumachi M (2000) Intraspecific DNA polymorphisms of *P. irregular*. Mycology research 104(11): 1333-1341.
- Nagaoka T, Ogiwara Y (1997) Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RAPD and RFLP markers. Theor Appl Genet Journal 94: 597-602.
- Ratnaparkhe MB, Santra DK, Tullu A, Muehlbauer F J (1998) Inheritance of inter-simple- sequence- repeat polymorphisms and linkage with a *fusarium* wilt resistance gene in chickpea. Theor Appl Genet 96: 348-353.
- Rush CM (1987) Root rot of sugar beet caused by *Pythium deliense* in the Texas Panhandle. Plant Disease 71:469.
- Safaie N, Alizadeh A, Saidi A, Rahimian H, Adam G (2005) Molecular characterization and genetic diversity among Iranian populations of *Fusarium graminearum*, the causal agent of wheat headblight. Iran. J. of Plant Pathology, 41: 171-189.
- Singelton LL, Miral JD, Rush CM (1990) Methods for Reaserch on Soilborn Phytopathogenic Fungi. APS Press.
- Sharma M, Gupta SK, Sharma TR (2005) Characterization of variability in *Rhizoctonia solani* by using morphological and molecular markers. Phytopathology 153: 449-456.
- Sheikholeslami M, Younesi H, Ershad J (2002) Identification of fungi involving sugar beet rot and their distribution in Kermanshah Provinc. 15<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, 133p.
- Stepansky A, Kovalski I, Perl-Treves R (1999) Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. Plant. Syst. Evol. 217: 313-332.
- Tsmmura Y, Ohba K, Strauss SH (1996) Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). Theor. Appl. Genet journal 92: 40-45.
- Van der Plaats- Niterink AJ (1982) Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology. Studies in Mycology 21: 1-242.
- Vasserur V, Rey P, Bellanger E, Brygoo Y, Tirilly Y (2005) Molecular characterization of *Pythium* group F isolates by ribosomal- and intermicrosatellite-DNA regions analysis. European Journal of Plant Pathology 112: 301-310.
- Wang PH, Wang YT, White JG (2003) Species-specific PCR primers for *Pythium* developed from ribosomal ITS1 region. Letters in Applied Microbiology 37:127-132.
- Xue S, Xuecheng Z, Yunxiang M, Zhenghong S, Song Q (2006) Identification of phase and sex-related ISSR markers of red alga *Gracilaria lemaneiformis*. Journal of Ocean Univrsity of China 5(1): 82-84.
- Youssuf AMH, Hani MAA, Jochen M, El-Hariry H (2005) Morphological and molecular identification of some closely related *Pythium* species in Egypt. Phytopathology and Plant Protection 38 (3): 193-208.
- Zamani Noor N, Minassian V, Banihashemi Z, Mostowfizadeh R (2004) Identification and pathogenicity of *Pythium* species on sugar beet in Khuzestan province. General Plant Pathology 40:179-200.
- Zietkiewicz E, Fafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.