

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^۱، ناصر صفائی^{۲*}، سید باقر محمودی^۳

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

۲- استادیار موسسه تحقیقات چغندر قند

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

(تاریخ دریافت: ۹۰/۰۲/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۳/۲۳)

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 چغندرکاری هشت استان کشور به تعداد ۱۰ تا ۲۰ نمونه از هر مزرعه، نمونه‌برداری شد. جدایه‌ها پس از خالص‌سازی، 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 خوش‌ای آغازگرها بر اساس روش UPGMA و ضریب جاکارد، در سطح تشابه ۶۴ درصد جدایه‌ها را به پنج گروه تقسیم کرد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل سرعت رشد جدایه‌ها در دو دمای $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ و $29\pm 2^{\circ}\text{C}$ ، توسط نرم افزار MSTACAT و MVSP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مولکولی و مورفو‌لوزیکی 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 مورفو‌لوزیکی،
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 *Pythium aphanidermatum* می‌شوند. بیماری پوسیدگی پی‌تیومی ریشه ایجاد شده توسط *Pythium aphanidermatum* در ایالت‌های آریزونا، کالیفرنیا، کلرادو، تگزاس، کانادا، استرالیا و ایران گزارش شده Fitzp است و پوسیدگی پی‌تیومی ریشه ایجاد شده توسط *P. deliense* Meurs نیز با علاطم 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 مورفو‌لوزیکی تشخیصی و تغییرپذیری ساختارهای مورفو‌لوزیکی در جنس *Pythium* همانند دیگر جنس‌های Oomycetes، استفاده از ویژگی‌های مورفو‌لوزیکی در شناسایی اعضای داخل

بیماریزا در مزارع چغندرقند، *P. aphanidermatum* از بیشترین پراکنده‌گی برخوردار است (Sheikholeslami et al. 2002). همچنین ثابت شده است که در مزارع چغندرقند شمال غرب ایران *P. aphanidermatum*, *P. ultimum* var. *ultimum* و *P. aphanidermatum* *Pythium* group HS بیماریزا بسیار بالایی روی ریشه‌های چغندرقند دارد (Babai-Ahary et al. 2004).

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

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

جداسازی

ریشه‌ها و گیاهچه‌های چغندرقند دارای علائم پوسیدگی به مدت ۲۰ دقیقه با آب شستشو داده شد. سپس به مدت ۲۰ ثانیه با الکل اتیلیک ۷۰ درصد ضدغونی و پس از دو بار شستشو با آب مقطر استریل روی کاغذ صافی آبگیری شد. از نمونه‌های ضدغونی شده قطعات نیم تا یک سانتیمتری از فواصل بین بافت آلوده و سالم جدا شده و در محیط کشت CMA [عصاره ۶۰ g دانه ذرت، ۲۰۰ mg کلرامفینیکل، 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 ریسه خالص شدند (Singleton et al. 1990). برای جداسازی *P. aphanidermatum* از خاک نیز از دو روش طعمه‌گذاری با بذر چغندرقند و دیگری کشت بذر چغندرقند در خاک آلوده و جداسازی قارچ از گیاهچه‌های آلوده به روش بالا Van der Plaats- Niterink (Singleton et al. 1990) انجام گرفت (1982).

خالص‌سازی و شناسایی

برای تهیه قارچ خالص از جدایه‌ها از روش کشت نوک ریسه 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 *P. aphanidermatum* و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های شناسایی استفاده شده عبارتند از: RFLP، AFLP، SSR، 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 Inter-simple ISSR (Moorman 2008 sequence repeat amplification) استفاده قرار گرفت (Zietkiewicz et al. 1994). در این نشانگر، از آغازگرهای SSR تغییریافته با ردیف‌های غیرتکرار 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 آغازگرهای قابلیت تکثیر نشانگر SSR را نیز داشته باشد (Zietkiewicz et al. 1994; Tsimmura 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 پی‌تی‌ام با استفاده از این نشانگر مشخص شد که در ژنوم گونه‌های این گروه متوفی‌های تکراری وجود دارد و ثابت شده که نشانگر ISSR توانایی تمایز بالایی را در تجزیه‌های مربوط به مطالعه میکریزها و پاتوژن‌ها دارد (Vasserur et al. 2005). پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه چغندرقند سال‌ها در استان‌های مختلف ایران دیده می‌شود و از آنجا که کشت چغندرقند در کشور حائز اهمیت می‌باشد، لذا داشتن اطلاع دقیق از نقش و اهمیت گونه‌های *Pythium* به عنوان عامل مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندرقند مهم می‌باشد. دو گونه *Pythium deliense* و *P. aphanidermatum* در استان‌های خوزستان و خراسان به ترتیب گونه‌های بیماریزا غالب هستند (Afzali and Ershad 2006; Zamani et al. 2006; Noor et al. 2004) در استان کرمانشاه نیز، در بین قارچ‌های

زیر نور فلورسانست نگهداری شدند. اسپوراتنژها 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 میلی‌متری 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. deliense* و یک جدایه *P. aphanidermatum*

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

قطر دو سانتی‌متر، توده میسلیوم‌ها با آب مقطر سترون شستشو و آبگیری شده و بلافضله در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۷۰- نگهداری شدند (Matsumoto et al. 2000).

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از روش صفائی و همکاران (روش کاربرد محلول نمکی DNA) استفاده شد (Safaei et al. 2005). اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه بیوفتومنتر و الکتروفورز نمونه‌های استخراج شده در ژل آگاروز 0.8% درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت.

اندازه‌گیری سرعت رشد

اندازه‌گیری سرعت رشد جدایه‌ها در دو دمای $^{\circ}\text{C}$ 26 ± 2 و 29 ± 2 ، 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 میسلیوم

جهت تهیه توده میسلیوم، حدود سه قرص از حاشیه فعلی کشت دو روزه جدایه‌ها به فلاسک‌های حاوی 50 ml از محیط کشت مایع (عصاره‌ی 200 g سیب زمینی و 15 mg دکستروز) منتقل و در دمای $^{\circ}\text{C}$ 25 به مدت چهار تا هفت روز روی شیکر در 110 rpm نگهداری شدند. بعد از تشکیل توده‌های میسلیومی به

جدول ۲- توالی آغازگرهای ISSR استفاده شده در این مطالعه

آغازگر	توالی	منبع	دمای اتصال (°C)
(TGTC) ₅	5'-TGTCTGTCCTGTCCTGTC-3'	(Xue et al. 2006)	۵۸
P1	5'-TCTCTCTCTCTCTCC-3'	(Stepansky et al. 1999)	۵۲
P4	5'-CTGGTGTGTGTGTGTGT-3'	(Bornet and Branchard, 2004)	۵۴
ISSR02	5'-ACTGACTGACTGACG-3'	(Sharma et al. 2005)	۵۳
LB-A	5'-(GACA) ₄ TA-3'	(Arbaoui et al. 2008)	۵۲
LB-B	5'-(GACA) ₄ TT-3'	(Arbaoui et al. 2008)	۴۸
LB-C	5'-(GACA) ₄ GT-3'	(Arbaoui et al. 2008)	۴۸
PcMs	5'-(GTC) ₇ -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 ضربیت شباهه جاکارد بدست آمده بود و تجزیه و تحلیل خوشه‌ای به کمک روش UPGMA در نرم افزار MVSP، دندروگرام مربوط به مجموع آغازگرهای رسم شد.

نتایج و بحث

شناسایی گونه *P. aphanidermatum* در شناسایی مورفولوژیکی گونه براساس شکل پرگنه و تولید ریسه‌های 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 مشابه 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 (Pa1:5'-CCACGTGAACCGTTGAAATC-3', ITS2: 5'-GCTCGTTCTTCATCGATGC-3') استفاده شد (Wang et al. 2003). واکنش PCR در مخلوط واکنش (50 mM KCL, 10 mM PCR Buffer ۲ μl از میکرولیتری حاوی ۲ mM MgCl₂, ۲ mM Tris-HCL, pH 9.0) میکرولیتری ۰/۴ μM از هر یک از dNTPها، ۰/۴ μM از هر یک از آغازگرهای Pa1 و ITS2 و ۰/۴ ng ng، ۰/۴ μM از هر یک از آغازگرهای Pa1 و ITS2 و ۰/۴ μM از DNA نمونه و ۲ واحد آنزیم Taq polymerase در ترموسایکلر اپندروف گرادیانت 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 نرده‌بان ژنومی ۱۰۰ bp روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد به مدت یک ساعت الکتروفورز شد.

شنانگر 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 μL میکرولیتری حاوی ۰/۵ μM از PCR Buffer ۱/۵ mM MgCl₂, ۱/۵ μM از ۲۰۰ μM ISSRها، ۰/۴ μM از هر یک از آغازگرهای ISSR نمونه و ۰/۵ μM واحد آنزیم Taq polymerase در ترموسایکلر اپندروف گرادیانت 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 مolar ۰/۴ ml/lit) و رنگ‌آمیزی با اتیادیوم 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 ۵ (TGTC)			آغازگرهای LB-C، LB-A و LB-B		
مدت زمان	درجه حرارت	مراحل	مدت زمان	درجه حرارت	مراحل
۵ دقیقه	۹۵°C	واسرشت اولیه	۲ دقیقه	۹۴°C	واسرشت اولیه
۲۰ ثانیه	$\begin{cases} 94^{\circ}\text{C} \\ 40 \end{math}$	واسرشت سازی اتصال	۱ دقیقه	$\begin{cases} 94^{\circ}\text{C} \\ 35 \end{math}$	واسرشت سازی اتصال
۱ دقیقه	$\begin{cases} 58^{\circ}\text{C} \\ 20 \end{math}$	اتصال	۱ دقیقه	$\begin{cases} 53^{\circ}\text{C} \\ 5 \end{math}$	اتصال
۲۰ ثانیه	$\begin{cases} 72^{\circ}\text{C} \\ 6 \end{math}$	گسترش اولیه گسترش نهایی	۵ دقیقه	$\begin{cases} 72^{\circ}\text{C} \\ 10 \end{math}$	گسترش اولیه گسترش نهایی
۶ دقیقه	$\begin{cases} 72^{\circ}\text{C} \\ 10 \end{math}$	گسترش نهایی			

آغازگر			آغازگرهای ISSR02، P4، P1		
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	۲۵ ثانیه	۴۵°C	اتصال اولیه
۲ دقیقه	۷۰°C	گسترش اولیه	۱ دقیقه	۷۲°C	گسترش اولیه
۱ دقیقه	$\begin{cases} 94^{\circ}\text{C} \\ 44 \end{math}$	واسرشت سازی اتصال	۱ دقیقه	$\begin{cases} 95^{\circ}\text{C} \\ 38 \end{math}$	واسرشت سازی اتصال
۱ دقیقه	$\begin{cases} 68^{\circ}\text{C} \\ 2 \end{math}$	اتصال	۲۵ ثانیه	$\begin{cases} 45^{\circ}\text{C} \\ 72^{\circ}\text{C} \end{math}$	گسترش
۲ دقیقه	۷۰°C	گسترش	۱ دقیقه	۷۰°C	گسترش
۱۰ دقیقه	۷۰°C	گسترش نهایی	۱۰ دقیقه	۷۰°C	گسترش نهایی

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 چندرقند از استان خراسان جدا و معروفی شده بود (Afzali and Ershad 2006). گونه *P. aphanidermatum* دارای پایه اووگونی راست و گونه *P. deliense* دارای 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 بسته شود. 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.



شکل ۱- الگوی باندی بدست آمده از جدایه‌های *P. aphanidermatum* با استفاده از جفت آغازگر ITS2 7D مربوط به جدایه‌های N: شناسنگر نزدیک ۱۰۰ bp ; Pa1/ITS2 L: N: شناسنگر نزدیک ۱۰۰ bp ; M: *P. aphanidermatum* چاهکهای ۱۰D تا 26D باشد که مشخصات آنها به طور کامل در جدول ۱ آورده شده است، ۵D N: *Phytophthora* :Ph *P. oliganderum* :PO ، *P. deliense* گونه N: *Phytophthora* :Ph *P. oliganderum* :PO ، *P. deliense* کنترل منفی

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.

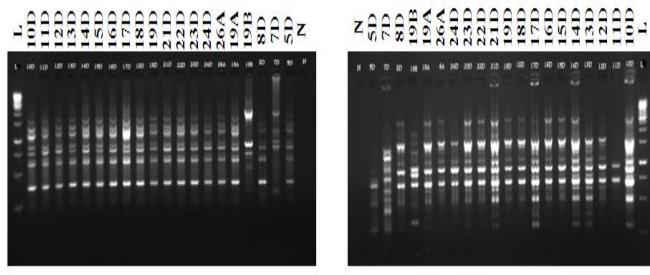
در سال‌های اخیر با پیشرفت تکنولوژی مولکولی و امکان مطالعه دقیق تنوع ژنومی در میکرووارگانیسم‌ها، ابزار لازم برای شناسایی تنوع ژنتیکی درون افراد یک گونه به خوبی فراهم شده است. قارچ *P. aphanidermatum* عامل بیماری پوسیدگی پی‌تی‌وی به علت اهمیتی که دارد در اکثر نقاط دنیا موضوع تحقیقات مختلف بر ISSR اساس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



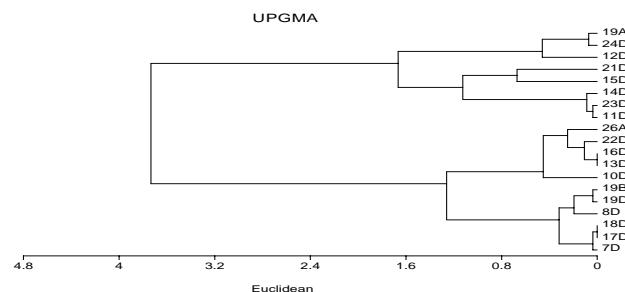
شکل ۲- مورفولوژی اسپورانژیوم و اووگونی قارچ *P. aphanidermatum*

سرعت رشد جدایه‌ها

رشد به طور متوسط 26 ± 2 و 29 ± 2 سانتیمتر در روز و سرعت رشد جدایه‌های تند رشد نیز 49 ± 5 و 5 سانتیمتر در روز به ترتیب در دمای 26 ± 2 و 29 ± 2 درجه سلسیوس بود. در این مطالعه ارتباطی بین سرعت رشد جدایه‌ها و پراکنش جغرافیایی آنها مشاهده نشد.



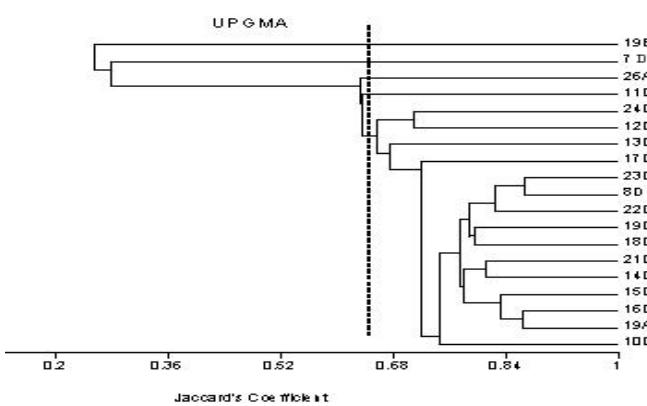
شکل ۴- الگوی باندی DNA تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای به ترتیب از چپ به راست LB-A و ISSR02 با نشانگر مولکولی ISSR. در ۱۹ جدایه *P. aphanidermatum* چاهکهای ۱۰D تا ۷D مربوط به جدایه‌های *P. aphanidermatum* می‌باشند که مشخصات آنها به طور کامل در جدول ۱ آورده شده است، گونه ۵D: نشانگر نردهبان ژنومی ۱Kb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



شکل ۳- گروه‌بندی ۱۹ جدایه *P. aphanidermatum* بر اساس سرعت رشد در دو دمای 26 ± 2 و 29 ± 2 درجه سلسیوس

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

نتایج حاصل از تلفیق هشت آغازگر و تجزیه خوشای 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



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

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. 17th 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 Scleritiorum* 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. *sporangiiferum*. Molecular Plant Microbe Interact, 7(6): 766-775.
- Garzon CD, Yanez JM, Moorman GW (2007) *Pythium cryptoirregular*, a new species within the *P. irregularare* 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 irregular* in southern Australia. Plant Pathology 49: 619-627.

زیادی از جمله فوزاریوم(Ratnaparkhe et al. 1998) و غیره استفاده شده است. 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 تمایز 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 استثنای 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 جدایه‌ای قرار دادند. طی یک تحقیقی روی AFLP در عمان، با استفاده از نشانگر *aphanidermatum* 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. irregularare* و *P. ultimum* 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. irregularare* 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. cryptotrichum* and *P. irregular* 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 mitochondrial 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 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, Mirial JD, Rush CM (1990) Methods for Research on Soilborne 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 Province. 15th 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.
- Tsimmura 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.
- Vassserur 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 University 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.