

مطالعه‌ی ساختار جمعیتی قارچ *Gnomonia leptostyla* عامل بیماری آنتراکنوز گردو در استان آذربایجان شرقی به روش PCR-RFLP

سیامک صلاحی^۱، محمد جوان نیکخواه^۲ و سلیمان جمشیدی^۳

چکیده

بیماری آنتراکنوز گردو یکی از مهمترین عوامل مهم خسارت‌زا به درختان گردو در نواحی مختلف دنیا و شایع‌ترین بیماری درختان گردو در مناطق مختلف گردوکاری ایران از جمله استان‌های شمالی، کرمانشاه، آذربایجان، خراسان، سمنان و کرج می‌باشد. در این تحقیق طی سال‌های ۸۴ و ۸۵ نمونه‌های برگ‌ی آلوده از مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری گردید. ۶۰ جدایه تک اسپور شده از قارچ عامل بیماری جهت مطالعه ساختار جمعیتی قارچ عامل بیماری بر اساس انگشت‌نگاری DNA به کمک تکنیک PCR-RFLP مورد مطالعه قرار گرفت. استخراج DNA قارچ با استفاده از روش Rapid Mini-Preparation از پودر میسلیمی قارچ انجام شد. برای انجام PCR از دو جفت آغازگر طراحی شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی زیر واحد 18s-SrDNA و ناحیه ITS ریبوزومی استفاده گردید. قطعات تکثیر شده تحت تأثیر آنزیم‌های برشی قرار گرفتند. از بین آنزیم‌های اندونوکلئازی مورد استفاده، سه آنزیم Sma I، Dra I و Bsu II در ناحیه SrDNA و آنزیم‌های Hinf I، Hind III در ناحیه ITS موفق به برش قطعات گردیدند. نتایج نشان داد که از میان قطعات برش داده شده توسط آنزیم‌های برشی، الگوی پدید آمده روی ژل آگارز برای کلیه جدایه‌های مورد استفاده یکسان بوده و در حقیقت به نوعی همولوژی در ساختار جمعیتی این قارچ می‌توان تصور نمود.

واژه‌های کلیدی: آنتراکنوز گردو، تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیتی، قارچ، بیماری

۱- کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه Siamaksalahi@yahoo.com

۲- عضو هیأت علمی گروه گیاه‌پزشکی دانشکده باغبانی و گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی کرج، دانشگاه تهران

۳- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه

گیاهان، مطالعه جنبه های بیولوژی ملکولی و شناخت ساختار جمعیتی آنها بسیار مهم است. در این زمینه استفاده از روش های ملکولی به ویژه انگشت نگاری DNA مفید خواهد بود (۴ و ۵). در واقع، انگشت نگاری DNA شناسایی به موقع جمعیت بیمارگر برای جمعیت میزبان و نیز بررسی نحوه تغییرپذیری جمعیت ها را ممکن می سازد. تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی و روابط درون یا بین جمعیت ها، ابزار اصلی بسیاری از روش های علم بیولوژی محسوب می شود (۵). توالی های rDNA در مورد تعداد زیادی از یوکاریوت ها شناخته شده است و این اجازه را می دهد که آغازگرهای ویژه یک گونه خاص، جنس یا خانواده، طراحی شوند (۱۱ و ۱۲). در خصوص تعیین تنوع ژنتیکی *G. leptostyla* تحقیقات بسیار اندکی صورت گرفته است. بلیساریو و همکاران (۱۹۹۹) با استفاده از تکنیک ملکولی PCR-RFLP، وجود تنوع ژنتیکی در جدایه های جمع آوری شده از ایتالیا را مورد بررسی قرار دادند. در طی این تحقیق نواحی کدکننده برای زیر واحدهای کوچک ریبوزومی و نواحی ITS مورد بررسی قرار گرفتند و پلی مورفیسم بین جدایه های مورد مطالعه یافت نشد (۱۳).

هدف از این تحقیق دستیابی به اطلاعاتی از ساختار ژنتیکی این قارچ و معرفی تنوع احتمالی جمعیت های موجود در منطقه برای بکارگیری در برنامه های به نژادی و واکنش ارقام و نیز مدیریت کنترل بیماری بود.

مواد و روش ها

طی سال های ۱۳۸۴ و ۱۳۸۵، نمونه های برگي آلوده به قارچ عامل بیماری آنتراکنوز از باغات

مقدمه و بررسی منابع

بیماری لکه سیاه یا آنتراکنوز گردو در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۳۱ توسط خیبری گزارش شد. این بیماری در نواحی شمال کشور از جمله مازندران و گرگان، آذربایجان شرقی و غربی، کرمانشاه، خراسان، سمنان، قزوین، کردستان و استان های مرکزی انتشار دارد (۲۱).

خسارت بیماری در باغات گردوی استان آذربایجان شرقی همواره قابل توجه بوده به طوری که در برخی از سال ها و برخی نواحی، اکثر درختان گردو شدیداً به این بیماری مبتلا شده اند (۱). این بیماری همچنین از مناطق مختلف دنیا از جمله آمریکای شمالی، آسیا، قسمت هایی از اروپا مانند فرانسه، بلغارستان، ترکیه، یونان، ایتالیا و غیره گزارش شده است (۲). عامل این بیماری قارچ *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & de Not. فرم غیرجنسی *Marssonina juglandis* (Lib.) Sacc. می باشد. زمستان گذرانی قارچ اغلب به صورت پریتسیوم در سطح پستی برگ ها و گاه میوه های ریخته شده در پای درخت و نیز زخم های روی شاخه های یکساله صورت می گیرد (۱ و ۳).

قارچ ها دارای ساز و کارهای مختلفی در ایجاد تغییر ژنتیکی در چرخه زندگی خود از طریق تولیدمثل جنسی یا غیرجنسی هستند. نتایج تغییرپذیری در قارچ ها از چند نظر دارای اهمیت است. این تغییرات می تواند ارتباط بیمارگر با میزبان خود را تا حدود زیادی تحت تأثیر قرار دهد. تنوع پذیری ژنتیکی به قارچ ها امکان می دهد تا به راحتی با تغییرات شرایط محیطی خود و یا با ورود ژنوتیپ های جدید گیاهی با میزبان خود سازگار شوند. برای پیشگیری و مبارزه با بیماری های قارچی

عبور داده شد. برای انجام PCR از دو جفت آغازگر طراحی شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی زیر واحد 18s-SrDNA و ناحیه ITS ریبوزومی (تهیه شده از شرکت MWG-Biotech) استفاده گردید (۱۵).

تکثیر DNA در حجمی معادل ۵۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR انجام گردید. مقادیر وزنی هر یک از مواد شامل ۱/۶ میکرولیتر از هر آغازگر، ۳۶ نانوگرم از DNA ژنومی، ۰/۴ میلی مول dNTPs (متشکل از غلظت‌های برابر dATP، dTTP، dCTP و dGTP)، ۲ میلی مول MgCl₂، ۲/۵ واحد آنزیم Smart Taq DNA Polymerase در بافر ۱۰x PCR بود. ضمن اینکه پنج واحد آنزیم معادل با یک میکرولیتر از آن بود. مولاریته dNTPs، ۱۰ میلی مولار و مولاریته MgCl₂، ۵۰ میلی مولار بود.

ابتدا مواد فوق به جز DNA ژنومی در یک لوله ۱/۵ میلی لیتری تمیز و استریل ریخته شده و به خوبی مخلوط گردید. برای احتیاط، در هر بار که این مخلوط تهیه می‌شد ۱۰ درصد بیش از حجم مورد نیاز تهیه می‌شد. این مقدار بستگی به تعداد نمونه DNA در هر برنامه حرارتی PCR داشت. واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی^۱ ITS1، ITS4، NS1 و NS8 در دستگاه Thermal cycler مدل GP001، ساخت شرکت Corbett Research استرالیا انجام گرفت. سیکل‌های حرارتی به شرح زیر بود. واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ °C و به مدت زمان ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه

گردوی استان آذربایجان شرقی از جمله شهرهای میانه، مراغه، تبریز، مرند، اسکو، عجب شیر، اهر، کلیر و خسروشهر، از درختان گردو برداشت گردید. برای جداسازی جدایه‌ها، نمونه‌های برگ‌های آلوده به مدت دو ساعت در زیر آب روان قرار داده شده و ضد عفونی سطحی آنها با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت یک دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. برگ‌ها پس از رطوبت‌زدایی بر روی کاغذ صافی استریل، به قطعاتی به اندازه تقریبی یک سانتی‌متر مربع بریده شده و به تشتک‌های پتری حاوی محیط‌های کشت مصنوعی OMA منتقل شدند. ۶۰ جدایه قارچی پس از خالص‌سازی به روش تک اسپور، بر روی کاغذ صافی کشت و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد برای استفاده‌های آتی نگهداری شدند.

جهت آماده سازی میسلیموم قارچ و استخراج قطعات، کاغذ صافی حاوی هر یک از جدایه‌ها بر روی محیط غذایی OMA حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات استرپتومایسین کشت شدند. سپس جدایه‌ها به محیط کشت مایع PDB^۱ منتقل شدند. کشت‌ها به مدت پنج روز در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد روی شیکر انکوباتور قرار گرفتند.

استخراج DNA به روش Rapid Mini-Preparation ارایه شده توسط ليو و همکاران (۲۰۰۰) با اندکی تغییر انجام شد (۱۴). برای حصول اطمینان از موفقیت در استخراج DNA و نیز جهت تعیین غلظت DNA استخراج شده، سه میکرولیتر از محلول DNA با یک میکرولیتر بافر نمونه (۰/۲۵٪ بروموفل بلو و ۰/۴۰٪ ساکارز در آب مقطر دیونیزه شده) مخلوط گردید. دو میکرولیتر از این مخلوط از ژل آگارز ۱٪

2- ITS1 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'

ITS4 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'

NS1 5'- GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3'

NS8 5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3'

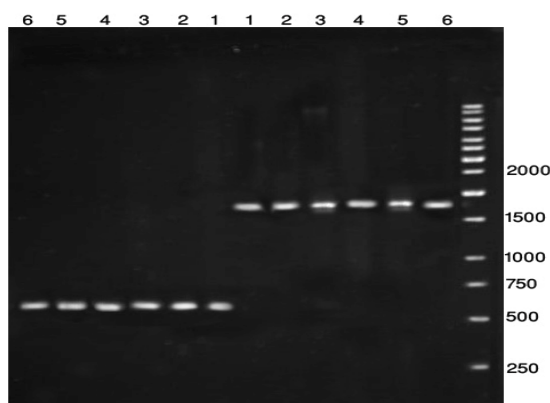
1- Potato Dextrose Broth

صلاحی، س. مطالعه ساختار جمعیتی قارچ...

۰/۵ میکرولیتر آنزیم برشی و پنج میکرولیتر محصول PCR از DNA ریپوزومی تکثیر شده به همراه ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه بود. واکنش‌ها سپس به مدت یک ساعت و نیم در انکوباتور 37°C قرار گرفتند. جهت ارزیابی محصولات هضم شده، در ژل حاوی آگاروز ۱ درصد و سیستم بافری IX TBE این محصولات عبور داده شدند. رنگ آمیزی نیز به مدت نیم ساعت در محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر) و بدنبال آن رنگبری در آب مقطر انجام شد و سپس توسط دستگاه Gel Document عکس برداری صورت گرفت. پس از آزمایش آنزیم‌های برشی فوق روی چند جدایه، آنزیم‌هایی که قادر به برش دادن قطعات بودند روی بقیه ۶۰ جدایه نیز استفاده شدند.

نتایج و بحث

DNA استخراج شده و حل شده در بافر TE از ژل آگارز یک درصد عبور داده شد تا از وجود DNA مطمئن گشته و غلظت آن تعیین شود (شکل ۱).



شکل ۱- تعیین غلظت DNA استخراج شده

روی ژل آگارز یک درصد

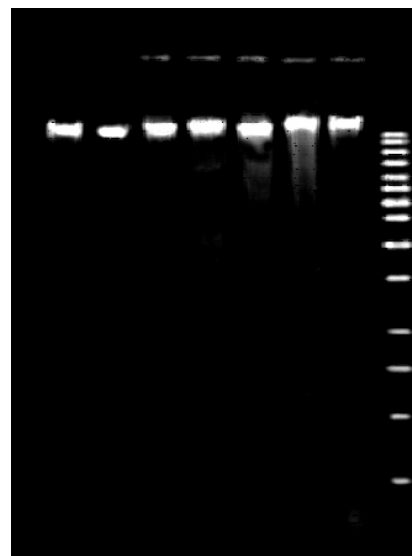
دو آنزیم Hinf I و Hind III دارای محل تشخیص و برش روی ناحیه تکثیر شده ITS بودند. محصول

صورت گرفت. در ادامه ۳۰ سیکل تکثیر شامل: واسرشته سازی در 95°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، هم سرشته سازی در دمای 50°C درجه سانتی‌گراد در 30°C ثانیه و بسط DNA در دمای 72°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و 30°C ثانیه و بالاخره بسط نهایی در دمای 72°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. پس از انجام واکنش، محصول واکنش در فریزر در دمای -20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای دستیابی به میزان اختلاف توالی‌های DNA، محصولات تکثیر یافته با استفاده از آنزیم‌های برشی، تحت بررسی و ارزیابی قرار گرفت (۷). ناحیه تکثیر شده ITS توسط آنزیم‌های اندونوکلازی Hinf I, Hind III, Hpa II, Sac I, Dra I, Bsu I برش داده شدند. ضمن این‌که آنزیم‌های برشی Alu I, Bsu II, Msp I, Nar I, Dra I, Bgl II, Ecor Sma I نیز جهت هضم قطعات تکثیر شده 18s مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام این کار، پس از تهیه بافرهای رقیق کننده و نگهدارنده مقدار ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از آنزیم‌ها با ۸/۵ میکرو لیتر از بافر مخصوص هر آنزیم مخلوط گردید. واکنش‌های هضم شامل یک میکرولیتر بافر ویژه هضم هر آنزیم، نتیجه واکنش PCR برای ۴۰ جدایه قارچ، تکثیر دو قطعه DNA شامل یک قطعه در حدود ۱۸۰۰ جفت باز که توسط آغازگرهای NS8 و NS1 تکثیر گردیده که تقریباً شامل کل طول SrDNA (SSU) می باشد. آغازگرهای ITS و ITS4 نیز قطعه ای به وزن ۶۰۰ جفت باز تکثیر نمودند. در واقع این آغازگرها موفق به تکثیر کل ناحیه ITS، شامل ژن 5.8s به علاوه قطعه کوچکی از زیر واحدهای کوچک و بزرگ rDNA گردیدند (شکل ۲). از مجموع ۸ آنزیم استفاده شده

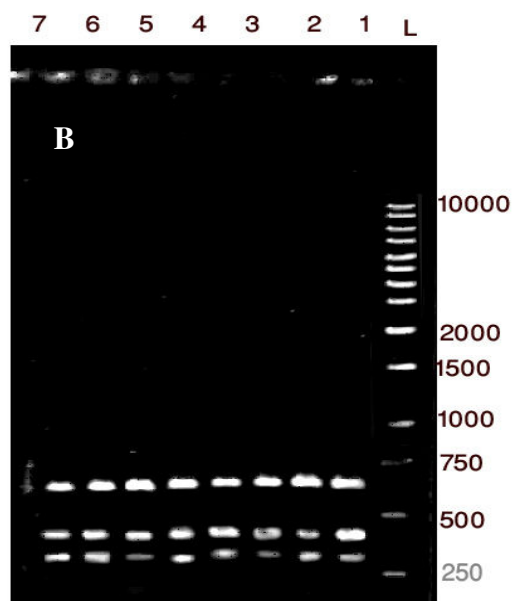
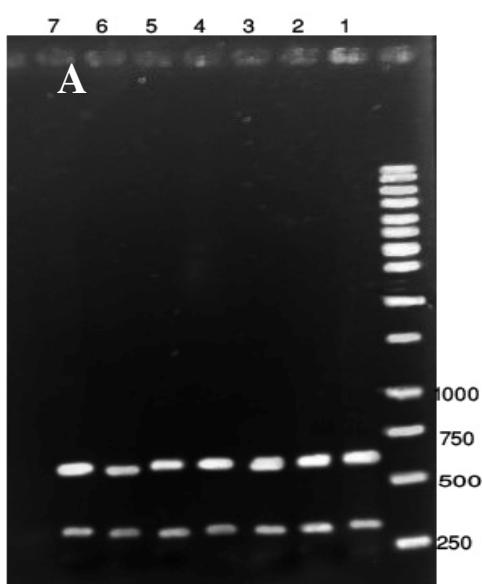
آنزیم *Sma* I و *Dra* I, *Bsu* II دارای محل تشخیص و برش روی این ناحیه شدند (شکل ۴). در نتیجه هضم آنزیم *Sma* I، سه قطعه به طول های ۴۵۰، ۲۷۰ و ۲۰۰ جفت بازی تولید شد.

در نتیجه برش آنزیم *Dra* I نیز سه قطعه با طول های ۱۴۵۰، ۱۲۵۰ و ۵۷۰ جفت بازی تولید شد و سرانجام آنزیم *Bsu* II دارای سه محل تشخیص روی ناحیه *SrDNA* بود که به واسطه آن چهار قطعه به بزرگی ۱۷۳۰، ۱۱۲۵، ۱۰۰۰ و ۸۵۰ جفت بازی ایجاد گردیدند. در مجموع نتایجی که از تاثیر آنزیم های محدود کننده روی جدایه های مختلف به دست آمد حاکی از آن بود که طبق این روش، بین جدایه های مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی تفاوتی وجود ندارد و همگی در یک گروه جای می گیرند.

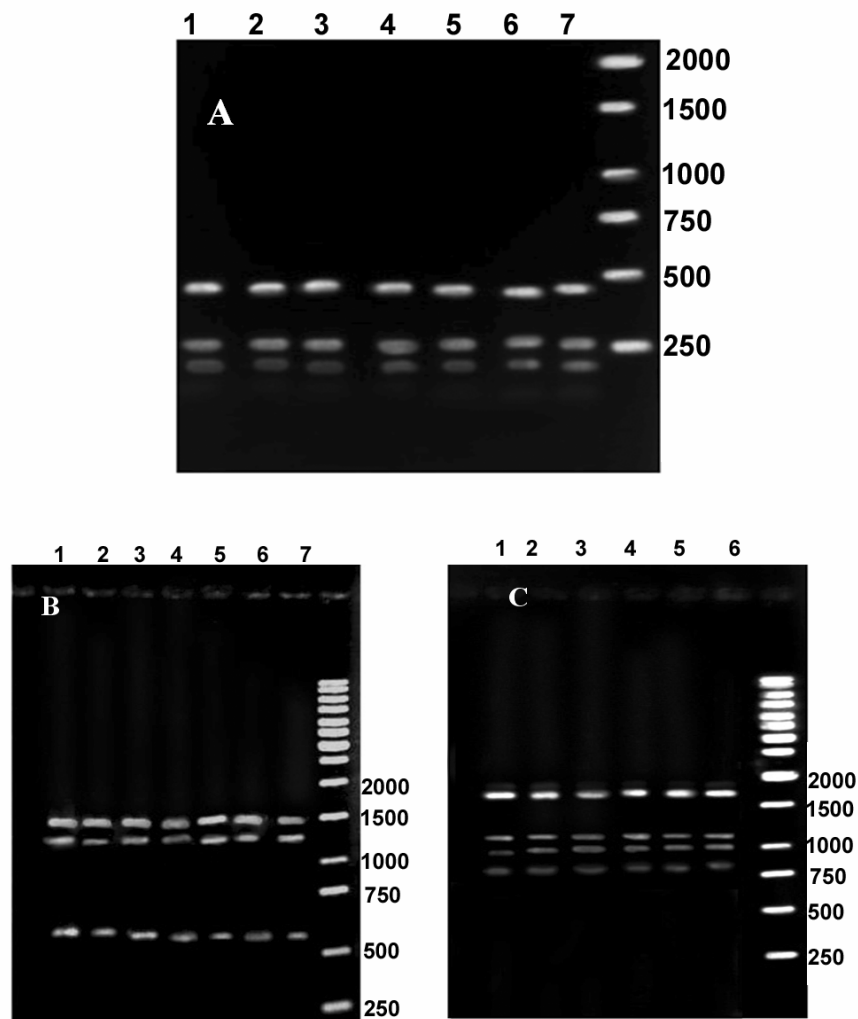


شکل ۲- قطعه DNA تکثیر شده توسط دو جفت آغازگر *G. leptostyla* NS1, NS8 و ITS1, ITS4

هضم آنزیم *Hinf* I، دو قطعه با بزرگی ۳۳۵ و ۲۶۵ جفت باز بود. آنزیم *Hind* III نیز با دو مکان تشخیص و برش روی محصول ITS تمام جدایه ها، سه قطعه به اندازه های ۶۳۰، ۴۲۰ و ۳۲۰ جفت باز تولید کرد (شکل ۳). در خصوص ناحیه *SSU* نیز سه



شکل ۳- باندهای حاصل از هضم محصولات PCR نواحی ITS و *SurDNA* جدایه های مختلف *G. leptostyla* با استفاده از آنزیم های برشگر (A) *Hinf* I و (B) *Hind* III روی ژل آگارز ۱/۵٪ رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید



شکل ۴- نقوش باندهای DNA حاصل از هضم محصولات PCR نواحی ژنهای ریبوزومی SrDNA جدایه های مختلف *G. leptostyla* با استفاده از آنزیم های برشی (A) *Sma I*، (B) *Dra I* و (C) *Bsu II*

توسط آنزیم‌های برشی نیز هیچ گونه اختلاف و تنوعی در آرایش و الگوی باندها دیده نشد. به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج به دست آمده از کارهای بلیساریو و همکاران (۱۹۹۲) همخوانی دارد. نتایج بدست آمده از تجزیه و تحلیل rDNA نشان دهنده پایداری بالا و نیز یکنواختی سطح ریبوزومی *G. leptostyla* می باشد بنابراین می توان فرض نمود که احتمالاً رشد و توسعه نژادهای

ناحیه ITS به عنوان یکی از رایج ترین نواحی DNA قارچ ها محسوب می شود که به خاطر تغییر پذیری بالای آن بیشتر از سایر نواحی rDNA (LSU و SSU)، در سیستماتیک مولکولی در سطح گونه و حتی داخل گونه مورد استفاده قرار می گیرد.

طبق آزمایش های انجام گرفته هیچ تفاوتی در طول نواحی ITS و SrDNA، از میان ۶۰ جدایه قارچی مشاهده نگردید. ضمن اینکه در نتیجه هضم قطعات

مؤثر خواهد بود. تحقیقات بیشتر در این زمینه می تواند در برنامه های اصلاح نژاد و تولید و تکثیر ارقام مقاوم و متحمل گردو در برابر بیماری آنتراکنوز مد نظر قرار گیرد و با وجود تفاوت های انفرادی در خصوصیات ریخت شناسی مانند نوع کشت، میزان رشد و باردهی نیاز به بررسی های بیشتری می باشد.

گونگون مانند نژادهای جغرافیایی رخ نداده است. ضمن این که به نظر می رسد جهت دستیابی به نتایج دقیق تر استفاده از تکنیک های دیگر همچون استفاده از آغازگرهای IGS و نیز روش rep-PCR مناسب تر بوده و استفاده از جدایه هایی با دامنه پراکنش جغرافیایی بیشتر و روی میزبان های دیگری از جنس *Juglans* نیز در حصول تنوع ژنتیکی در این قارچ

منابع

۱. بهداد، ا. ۱۳۶۹. بیماری های درختان میوه ایران، چاپ دوم. انتشارات نشاط اصفهان، ۲۹۳ ص.
۲. صارمی، ح. و ر. رزاز هاشمی. ۱۳۷۹. پراکنش و اپیدمی لکه سیاه گردو در غرب کشور. چهاردهمین کنگره گیاه پزشکی ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحه ۳۳۲.
۳. جوان نیکخواه، م. ۱۳۸۰. تحقیق روی تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ (*Magnaporthe grisea* (Hebert) عامل بیماری بلاست برنج، با استفاده از خصوصیات مولکولی، بیماریزایی و سازگار رویشی در استان گیلان. رساله دکتری در رشته بیماری شناسی گیاهی. دانشگاه تهران، کرج، ایران. ۱۷۰ ص.
۴. شهریاری، ف. و ع. امام جمعه. ۱۳۸۱. واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR، مقدمه ای بر تکنیک های مولکولی (ترجمه). دانشگاه امام رضا (ع). ۲۲۸ ص.
۵. شیخ الاسلامی، م. ۱۳۸۴. بررسی برخی خصوصیات بیولوژی و تنوع ژنتیکی *Erysiphe betae* عامل بیماری سفیدک پودری چغندر قند. رساله دکتری بیماری شناسی. گروه گیاه پزشکی. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تهران. ۱۳۴ ص.
6. Aanen, D.K., T.W. Kuiper and R.F. Hoekstra. 2001. A widely distributed DNA polymorphism within a biological species of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma velutipes*. Mycol. Res. 105 (3): 284-290.
7. Belisario, A., M. Hubbes. 1992. Genetic Variability in *Gnomonia leptostyla*. ISHS Acta Horticulturae. 385-387.
8. Black, W.M., and D. Neely. 1974. Effect of select environmental. American Phytopathological Society, 3: 284. USA.
9. Bruns, T.D., T.J. White, and J.W. Taylor. 1992. Evolutionary relationship within the fungi: analyses of small subunit rRNA sequences. Mol. Phylogen. Evol. 1: 231-243.
10. Buchko, J., and G.R. Klassen. 1990. Detection of length heterogeneity in the ribosomal DNA of *Pythium ultimum* by PCR amplification of the intergenic region. Curr. Genet. 18: 203-205.
11. Gardes, M. and T.D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2: 113-118.
12. Gargas, A., P.T. Depriest. 1996. A nomenclature for fungal PCR primers with example from intron-containing SSU rDNA. Mycologia 88: 745-748.

13. Harrington, T.C., J. Steimel, F. Workneh and X.B. Yang. 2000. Molecular identification of fungi associated with vascular discoloration of soybean in the north central United States. *Plant dis.* 84: 83-89.
14. Liu, D., S. Coloe, R. Baird, and J. Pedersen. 2000. Rapid Mini-preparation of Fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 471.
15. White, T.J., T. Bruns, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols, A guide to methods and amplification*. Academic press San Diego, 315-322.
16. Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and W. Meyer. 1995. DNA fingerprinting in plant and fungi. *CRC Press*. PP. 322.