بررسی تنوع ژنتیکی.*Uncinula necator* (Schw.)Burr عامل بیماری سفیدک سطحی مو با استفاده از مارکر مولکولی دراستان خراسان

محمد حاجیان شهری*- جواد زاد- عباس شریفی تهرانی- محمود اخوت- عباس صفرنژاد[1]

تاریخ دریافت:۸۵/۱۲/۶

تاریخ پذیرش:۸۶/۸/۱۹

چکیده

۳۴ جدایه *Uncinula necator* ازموستانهای سطح استان خراسان از خرداد ماه تا شهریور ماه سال ۱۳۸۲جمع آوری شدند. این جدایه‌ها بااستفاده از برگهای سالم نهالهایی که با بهره گیری از روش ریزازدیادی تکثیر شده بودند، تک اسپور شدند. DNA این جدایه‌ها استخراج و تنوع ژنتیکی بین جدایه‌ها با استفاده از تکنیک RAPD-PCR واستفاده از ۲۲ آغازگر ارزیابی شد. برای تولید مواد قارچی لازم در این تحقیق از حداقل ۱۰ برگ انگور استفاده شد و میانگین تولید اندامهای قارچ عامل بیماری در هر جدایه ۱۲ روز پس از مایه زنی بین ۳۸-۶ میلی گرم متغیر بود. آنالیز خوشه‌ای ۱۲۶ بند به دست آمده بر اساس تکنیک RAPD-PCR دو گروه مشخص ژنتیکی را آشکار کرد. گروه اول شامل ۱۱جدایه جمع آوری شده در مرحلهٔ اول (خرداد ماه تا تیرماه) که ۴۷ بند DNA تولید کردند و ۲۴ عدد آنها پلی مورفیک و میانگین عدم شباهت ژنتیکی به دست آمده برای این جدایه‌ها ۲/۸٪بود. جدایه‌های گروه دوم (مرداد ماه تا شهریور ماه) ۷۹ بند DNA تولید کردند که ۳۳ عدد آنها پلی مورفیک بودند ومیا نگین عدم شباهت ژنتیکی به دست آمده برای این جدایه‌ها ۶/۸٪بود. ازمجموع ۱۲۶ بندRAPD مشخص که از ۳۴ جدایه مورد آزمایش به دست آمد ۵۷ بند یا ۴۵ درصد بندها پلی مورفیک بودند، درمیان ۳۴ جدایه ۲۷ بند با فرکانس ۹۰-۱۰ درصد وجود داشتند و میانگین عدم شباهت ژنتیکی به دست آمده برای ۳۴ جدایه ۰/۰۷۳۵ بود. اطلاعات مولکولی و بیولوژیکی به دست آمده نشان دادند که دسته بندی جدایه‌ها در دوگروه، نمایندهٔ دو بیوتیپ مختلف می‌باشند که ازنظر ژنتیکی قابل تفکیک می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: سفیدک سطحی، انگور، تنوع ژنتیکی، خراسان و*Uncinula necator* RAPD-PCR

مقدمه

قارچ عامل بیماری سفیدک سطحی مو *Uncinula necator (Schwein)Burrill* یکی از مهمترین قارچهای بیماری زای این گیاه است(۱،۱۰). این قارچ در حال حاضر در تمام نواحی موکاری دنیا گسترش دارد اما اعتقاد بر این است که منشا آن امریکای شمالی می‌باشد(۱۰). این قارچ هتروتال بوده و در بسیاری از نواحی دنیا به شکل کلیستوتسیوم زمستان گذرانی می‌کند(۲،۱۱،۱۲). از آنجایی که این قارچ پارازیت اجباری است. اطلاعات کمی درباره تنوع ژنتیکی آن، اپیدمیولوژی یا اهمیت تولید مثل جنسی آن وجود دارد.

۱. استادیار پژوهش مرکزتحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان ، استادان ، استادیارگروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران واستادیار مرکزتحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان

* نویسنده مسئول Email:Mhagi52570@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

در راستای بررسی تنوع ژنتیکی این گونه قارچی در دنیا بر اساس تکنیک RAPD-PCR کارهای زیادی انجام شده است (۳،۴،۵،۶،۲۰) و استفاده از این تکنیک ابزار مفیدی برای مطالعه ژنتیک مولکولی این قارچ می‌باشد. نشانگرهای RAPD نشانگرهای غالب می‌باشند اما *U. necator* یک گونه قارچی هاپلوئید و تک هسته‌ای می‌باشد که تا حد زیادی مطالعه ژنتیکی و آنالیز اطلاعات بدست آمده از آنرا بر اساس این تکنیک آسان می‌نماید(۴). سیستمهای اطلاعاتی برای مطالعه ژنتیک مولکولی *U. necator* بوجود آمده است. گادوری و پیرسون (۱۰) روش کشت این گونه قارچی را در In vitro توصیف کردند و در اروپا با استفاده از روشهای PCR با آغازگرهای تصادفی (۳) و در استرالیا جنوبی با استفاده ازآغازگر ISJR1 تنوع ژنتیکی آن شناسایی شده است (۲۰). در همین ارتباط اوا نس و همکاران (۹) سطح بالایی از تنوع ژنتیکی، در بین جدایه‌های *U. necator* را با استفاده از تکنیک RFLP با دو نشانگر نشان می‌دهند. در مقابل دلیه و همکاران(۳ و۴) سطح پائین‌تری از تنوع ژنتیکی را در میان جدایه‌های اروپایی و هندی این قارچ با استفاده از نشانگرهایRAPD را بدست آورده‌اند. است ومر و همکاران (۲۰) در مطالعه مقایسه‌ای بین روش RFLP و روشهای مولکولی مبتنی بر PCRنشان دادند که تکنیک RFLP سطح تمایز بالاتری را در بینجدایه های*U. necator* به دست می‌دهد ولی هردوی این نشانگرها شباهت درونی این قارچ را می‌توانند مشخص کنند و در هر روش جدایه‌های *U. necator* دردو گروه متمایز قرار می‌گیرند. لذا با توجه به سطح قابل توجه انگورکاری واهمیت بیماری سفیدک سطحی مو در استان خراسان این تحقیق با هدف بررسی میزان اختلاف ژنتکی موجود بین جدایه‌های *U. necator* به منظور استفاده از اطلاعات به دست آمده و اطلاعات موجود در زمینه بیولوژی واپیدمیولوژی این بیماری در جهت مدیریت راهبردی این بیماری انجام گرفت.

مواد و روش ها

تولید انبوه جدایه‌های قارچ عامل بیماری

برای تولید انبوه جدایه‌های *U. necator* و نیاز به برگهای سالم درطول این تحقیق از روش ریز ازدیادی برای تکثیر سریع و زیاد انگور رقم عسکری براساس روش گادوری پیرسون (۱۰) استفاده شد. جوانه‌های انتهایی انگور رقم عسکری به قطعات ۵ میلی متری بریده شدند و روی محیطMS (۱۵) شامل تمامی مواد غذایی در نصف غلظت، ۱۵ گرم در لیتر ساکارز، یک صدم میلی گرم در لیتر آلفا نفتالن اسید استیک (NAA) و ۷ گرم در لیتر آگار گذاشته شدند. pH محیط قبل از اضافه کردن آگار و اتوکلاوکردن به ۵/۸ تنظیم شد. محیطهای کشت در ۲۵ درجه سانتی گراد با دوره نوری- تاریکی ۱۶ ساعته و شدت نوری ۴۰۰-۲۵۰ $\mu Es^{-1}m^{-2}$ (میکرومول الکترون در ثانیه بر مترمربع) نگهداری شدند. بعد از ۱۰ روز، اغلب نمونه هایی که ریشه‌های کوچکی تولید کرده بودند به ظروف بزرگتری که حاوی محیط کشتMS ولی بدون هورمون بودند انتقال یافتند. پس از آنکه نمونه‌ها به اندازه کافی تولید ریشه کرده و دارای حداقل ۵ برگ بودند به محیط کشت هیدروپونیک حاوی محلول غذایی هویت در۰/۱ غلظت منتقل و در اطاقک کشت نگهداری شدند و بعد از رشد کافی به گلدانهای حاوی پیت - ماسه منتقل و در گلخانه نگهداری شدند. بااستفاده از این روش تعداد زیادی نهالهای انگور برای استفاده از برگ آنها تولید شد. از ۱۰- ۸ برگ برای تکثیر جدایه‌های جمع آوری شده و تهیهٔ میزان کافی مواد قارچی برای استخراج DNA مورد نظر استفاده شد و زمان ظهور کلنی‌های اولیه برای هر جدایه یادداشت برداری گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

تهیهٔ جدایه‌های تک اسپور *U. necator*

به منظور تهیه جدایه‌های تک اسپور از *U. necator* براساس روش دلیه و کوریو کاستت (۶) عمل شد. برگها یا حبه‌های انگور آلوده به عامل بیماری سفیدک سطحی انگور از نقاط مختلف استان در طول فصل بهار و تابستان سالهای ۱۳۸۱ و ۱۳۸۲ جمع آوری شدند. کلیه نمونه‌های جمع آوری شده بلافاصله درمیان برگهای سالم انگور بسته بندی و به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌های جمع آوری شده به مدت ۵- ۲ روز روی محیط آب- آگار ۲ درصد در پتری دیشهایی به قطر ۹ سانتی متر نگهداری شدند تا کلنی‌های *U. necator* اسپورزایی کنند. برگهای جوان انگور رقم عسکری که با روش کشت بافت تکثیر شده بودند از گلخانه جمع آوری و برای تهیه جدایه‌های خالص عامل بیماری استفاده شدند. این برگها در ابتدا در زیر هود لامینار به مدت ۵ دقیقه با استفاده از محلول هیپوکلرید سدیم ۱٪ ضد عفونی و سپس با آب مقطر استریل شستشو داده شده و در بین دو برگ کاغذ صافی استریل خشک شدند. برگهای فوق از محل دمبرگ در پتری دیشهای حاوی محیط آب - آگار ۲۰ گرم در لیتر و ۵۰۰ PPm بنزیمیدازول فرو برده شدند. یک تک کنیدی یا زنجیره‌ای از کنیدیها از برگهایی که جدایه‌ها در ابتدا روی آن تکثیر شده بودند با استفاده از یک سوزن تلقیح که به انتهای آن یک قطعه موی دم اسب چسبانده شده بود در زیر یک بینوکولر برداشته شد و در سطح رویی برگهای ضدعفونی شده سالم تلقیح شدند. پس از هربار استفاده این سوزن تلقیح با الکل ۷۰٪ ضدعفونی می‌شد. اطراف پتری دیشهای فوق با استفاده از پارافیلم مسدود گردید. برگهای تلقیح شده به مدت ۱۴ روز در دمای ۳+ ۲۲ درجه سانتیگراد و شدت نوری ۲۵۰ μEs^{-1} m^{-2} (میکرومول الکترون در ثانیه بر مترمربع) به مدت ۱۶ ساعت نگهداری شدند.

استخراج DNA براساس روش فنل – کلروفرم

استخراج DNA جدایه‌های جمع آوری شده با استفاده از روش Lee و همکاران (۱۴) وطی مراحل زیر انجام گرفت.

۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۵۰ میلی لیتر Tris-HCl، ۵۰ میلی لیتر EDTA و ۳٪ SDS) و ۴ میکرولیتر RNase به ۴۰ میلی گرم میسلیوم پودر شده قارچ در لوله های ۱/۵ میلی لیتری اضافه گردید. مخلوط به مدت ۱۰ ثانیه با همزن با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه هم زده شد. مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در آب ۶۵ درجه سانتیگراد در حمام آبی گرم گردید. ۷۰۰ میکرولیتر محلول فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۵:۲۴:۱) به مخلوط فوق اضافه گردید.مخلوط بدست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و ۳۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی مایع به دست آمده به یک لوله ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل گردید. ۳۰ میکرولیتر استات سدیم (۱ حجم فاز بالائی) و ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵٪ سرد (در فریزر نگهداری شده) به مایع بدست آمده اضافه گردید. مخلوط بدست آمده به مدت ۵ دقیقه باسرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و فاز بالایی دور ریخته شد. در پایان این مرحله مولکول‌های DNA به صورت یک توده سفید رنگ در ته لوله ته نشین می‌شدند. برای خشک کردن توده DNA، درب لوله‌ها را بازنموده و لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه به صورت وارونه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد درون انکوباتور قرارداده شدند. سپس لوله‌ها به حالت اول برگردانده شده و ۱۵ دقیقه درهمین حالت نگهداری شدند. درنهایت ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر و یا بافر TE (۱۰ میلی مول Tris، ۱ میلی مول EDTA) به مولکول‌های DNA درون لوله افزوده شد. بعد از ۵ دقیقه انتظار در شرایط حرارتی آزمایشگاه، لوله‌ها به آرامی با انگشت تکان داده شدند تا مولکولهای DNA در مایع آزاد شوند. لوله‌های حاوی DNA استخراج شده در فریزر نگهداری شدند. در پایان، وقتی عملیات استخراج

Archive of SID

www.SID.ir

DNA به پایان رسید، برای تعیین غلظت DNA استخراج شده قبل از انتقال به فریزر، سه میکرولیتر از محلول DNAبا یک میکرولیتر بافر نمونه(Gel loading Buffer) مخلوط گردید. ۲ میکرولیتر از این مخلوط از ژل آگارز ۰/۷ ٪ عبور داده شد.

آماده سازی مخلوط PCR

تکثیر DNA در حجمی معادل ۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR که مقادیر حجمی آنها در ذیل آمده است و بر اساس روش دلیه و همکاران (۳) با اندکی تغییر انجام گردید. مقادیر هر یک از مواد شامل۴/. میکرومول از آغازگرهای ۱۰ نوکلئوتیدی، ۱۰ نانو گرم DNA ژنومی، ۲۰۰ میکرومول از هریک dNTPs (dATP، dTTP، dCTP و dGTP)، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase در بافر PCR (۱۰ میلی مول تریس HCl، ۲۵ میلی مول کلرید پتاسیم، ۲ میلی مول کلرید منیزیم و ۱۷ میلی مول سولفات آمونیوم) بود. مخلوط چند بار به آرامی هم زده شد تا مواد و بخصوص آنزیم DNA پلیمراز بخوبی مخلوط شوند. آنگاه سه میکرولیتر از هر نمونه DNA ژنومی (DNA جدایه‌های مختلف) به کمک میکروپیپتهای ۱۰میکرولیتری به مخلوط درون هر لوله پلیت PCR اضافه شد.

تنظیم برنامه حرارتی برای واکنشPCR

لوله‌های ۱/۵ میلی لیتری حاوی مواد مخلوط PCR در ماشین ترمال سایکلر اپندورف گذاشته شد. آنگاه برنامه حرارتی برای واکنش PCR و تکثیر قطعات DNA در ۳۷ چرخه بصورت زیر تنظیم گردید:

یک چرخه در۹۴ درجه سانتیگراد دو دقیقه و به دنبال آن ۳۷ چرخه در۹۴ درجه سانتیگراد یک دقیقه، ۳۷ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد یک دقیقه و برنامه پایانی یک چرخه در۷۲ درجه سانتیگراد ۵ دقیقه، از آنجائیکه تکثیر قطعاتDNA به شرایط بسیار مناسب برای PCR نیاز داشت قبل از انجام تکنیکRAPD – PCR برای انگشت نگاریDNA جدایه‌های قارچ عامل بیماری، کل سیستم شامل مخلوطPCR، دستگاه ترمال سایکلروآنزیم پلیمراز با استفاده از شاهدهای منفی(جدایه‌های *Leveillula saxaouli*) و مثبت(*جدایه‌های U. necator*) سنجیده شده و بهینه گردید.

مشاهده محصول PCR

برای مشاهده محصول PCR، الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۲٪ به ابعاد Cm ۱۵ × ۱۰ انجام گردید. ۳/۵ میکرولیتر بافر رنگ (6X loading buffer) به محصولPCR به ازای هر نمونه اضافه گردید. آنگاه ۶ میکرولیتر از مخلوط محصول PCR و بافر به ازای هر نمونه در چاهک‌های ایجادشده روی ژل ریخته شد. عمل الکتروفورز در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۳ ساعت انجام گرفت. آنگاه ژل به منظور رنگ آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید(Etidium Bromide)(۰/۱٪ V/V در آب قرار به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد تا بندهای DNA آشکار شوند. برای عکسبرداری از نتیجه کار و محل قطعاتDNAجداشده، از دستگاه فتوگرافی (Gel documentation UVP)استفاده گردید. شکل ژل تحت یک فایل در کامپیوتر ذخیره شد. برای ارزیابی بندهای DNA و تعیین اندازه آنها از نرم افزار Labworks نسخه ۴ استفاده گردید. برای اطمینان از اینکه بندهای DNA تکرارپذیر هستند عمل PCR دو تا سه دفعه برای هر نمونه تکرار گردید و فقط قطعات DNA ای که باند خوبی از آنها روی ژل دیده می‌شد، ارزیابی شدند.

تجزیه و تحلیل داده ها

برای تعیین ارتباط ژنتیکی بین جدایه ها، ابتداجدایه هایی که براساس مشاهده شباهت الگوی DNA تکثیرشده بودند

Archive of SID

www.SID.ir

گروه بندی و اندازه هریک از بندهای DNA برای تمام جدایه‌ها مشخص و تمام بندهای قابل ارزیابی تعیین شدند. وجود و یا عدم وجود هریک از بندها بصورت اعداد یک و صفر(یک برای وجود هر بند DNA و صفر برای عدم وجود آن) در یک سیستم دوتایی(Binary System) برای هریک از جدایه‌ها تعیین و ثبت گردید. جدول ماتریکس دوتایی برای آنها ایجاد گردید. از این ماتریکس برای ایجاد ماتریکس شباهت بین جدایه‌ها (وقتی همه جدایه‌ها بصورت دو به دو با هم مقایسه شدند) براساس ضریب دایس (Dice´s Coefficient) استفاده شد (۱۶). براساس نتیجه ماتریکس شباهت، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای (Clusteranalysis) به کمک روش UPGMA (UnweightedPairGroupMethodWith ArithmaticAverage) در نرم افزار کامپیوتری(Statistica) نسخه ۶/۱ انجام شد و فنوگرام مربوطه رسم گردید برای محاسبه استحکام دندروگرام حاصل و تأئید اینکه تا چه حد کلاسترهای ایجاد شده واقعی می‌باشند، تجزیه و تحلیلBoot strap نیز براساس ماتریکس دوتایی با استفاده از نرم افزار فوق انجام گردید. در این روش تشکیل فنوگرام ۱۰۰ بار تکرارگردید و هربار نمونه‌ها بطور خودکار جابجا گردیده و محاسبه شدند و بهترین فنوگرام بدست آمد. به عبارتی بهترین حالتی را که جدایه‌های مشابه در یک گروه قرار می‌گرفتند تعیین گردید.

نتایج

نتایج این تحقیق نشان داد که روش ریز ازدیادی تکثیر مو با استفاده از جوانه‌های انتهایی این گیاه برروی محیطهای کشت بافت روش بسیار ساده و سریع برای تکثیر این گیاه در آزمایشگاه می‌باشد. در یک دورهٔ ۳۰ روزه بااستفاده ازاین روش تعداد زیادی نهال مو به دست آمد که برای تکثیر و تک اسپور کردن جدایه‌های عامل بیماری مورد استفاده قرارگرفتند و ۳۴ جدایه عامل بیماری بااستفاده از برگهای سالم نهالهایی که بااستفاده از روش ریزازدیادی تکثیر شده بودند تک اسپور شدند. برای تولید مواد قارچی لازم به منظور استفاده در روش RAPD-PCR از حداقل ۱۰ برگ مو استفاده شد. عملکرد تولید اندامهای قارچ عامل بیماری ۱۲ روز پس از مایه زنی عامل بیماری بین ۳۸-۶ میلی گرم متغیر بود. جمع آوری اندامهای قارچی از سطح برگها حداکثر در دو مرحله امکان پذیر بود و به علت پیرشدن برگها تولید اندامهای قارچی به شدت کاهش می‌یافت.

دراین تحقیق، ۳۴DNA جدایه *U. necator* جمع آوری شده از مناطق مختلف استان استخراج گردید و کمیت و کیفیت آن اندازه گیری شد (جدول ۱). سپس با استفاده از ۲۲ آغازگر RAPDبراساس واکنشRAPD –PCR که تکثیر قطعات DNA ژنوم قارچ را امکان پذیر ساخت مورد ارزیابی قرارگرفتند. در اثر واکنشPCR، طول قطعات DNA تکثیر شده از ژنوم قارچ بین ۲۰۰ جفت باز تا ۳ کیلو باز متفاوت بودند.البته تعداد بندهایی کوچکتر از ۲۰۰ جفت باز یا بزرگتر از ۳ کیلو جفت باز نیز در واکنشهای PCR به دست آمدند که به علت عدم تکرارپذیری در ارزیابی استفاده نشدند. جدایه هایی که مورد آزمایش قرار گرفتند تعداد زیادی لوکوسهای RAPD را مشخص کردند اما هیچ کدام از آغازگرها به تنهایی نتوانستند تمامی ۳۴ جدایه را از هم تفکیک کنند. بین یک تا ۹ باند RAPD با هر آغازگر و در کل تعداد ۱۲۶ قطعه DNA تکثیرشده (۱۲۶ amplicon) قابل ارزیابی در جدایه‌های مختلف قارچ به دست آمد (جدول ۲). تمامی آمپلی کونهای به دست آمده برای ساخت ماتریکس فاصلهٔ ژنتیکی مورد استفاده قرارگرفت. فنوگرام ایجاد شده از آنالیز خوشه‌ای اطلاعات RAPD از ۳۴ جدایه به دست آمده با استفاده از روش UPGMA در شکل ۱ نشان داده شده است. براساس نتیجه ماتریکس

Archive of SID

www.SID.ir

شباهت و تجزیه و تحلیل خوشه‌ای (Cluster analysis) به کمک روش UPGMA دو گروه مشخص ژنتیکی (گروههای I و II) شناسایی شد. تجزیه و تحلیل Bootstrap ۱۰۰ بار تکرار گردید. نتایج نشان داد که این گروهها در صد درصد فنوگرام ایجاد شده وجود دارند. گروه اول شامل ۱۱جدایه جمع آوری شده در مرحلهٔ اول (خرداد ماه تا تیرماه) بودند که۴۷ بند DNA تولید کردند که ۲۴ عدد آنها پلی مورفیک و میانگین عدم شباهت ژنتیکی به دست آمده برای این جدایه‌ها ۲/۸٪بود. در این گروه، ۱۳٪ این بندها در بین ۱۱ جدایه، بندهای نادر بودند. جدایه‌های گروه دوم (مرداد ماه تا شهریور ماه) ۷۹ بند DNA تولید کردند که ۳۳ عدد آنها پلی مورفیک بودند و میانگین عدم شباهت ژنتیکی به دست آمده برای این جدایه‌ها ۶/۸٪بود. ازمجموع ۱۲۶ بندRAPD مشخص که از ۳۴ جدایه مورد آزمایش به دست آمد، ۵۷ بند یا ۴۵ درصد بندها پلی مورفیک بودند، درمیان ۳۴ جدایه ۲۷ بند با فرکانس ۹۰-۱۰ درصد وجود داشتند و میانگین عدم شباهت ژنتیکی به دست آمده برای ۳۴ جدایه ۰/۰۷۳۵ بود.

جدول(۱) منشاء جغرافیایی جدایه‌های *U. necator* مورد استفاده دراین تحقیق

جدایه ها	کدجدایه ها	محل جمع آوری	رقم میزبان	تاریخ جمع آوری
مشهد	Ma1	شیرحصار	عسکری	مرداد ۱۳۸۱
مشهد	Ma2	شیرحصار	عسکری	مرداد ۱۳۸۲
مشهد	Ma3	بخش مرکزی	عسکری	تیر ۱۳۸۱
مشهد	Ma4	بخش مرکزی	عسکری	شهریور ۱۳۸۲
قوچان	Gho1	الماجق	فخری	شهریور ۱۳۸۲
قوچان	Gho2	مرکزی	کشمشی	مرداد ۱۳۸۲
قوچان	Gho3	مرکزی	کشمشی	مرداد ۱۳۸۲
بجنورد	Bog1	بدرانلو	فخری	مرداد ۱۳۸۲
بجنورد	Bog2	بدرانلو	شاهرودی	مرداد ۱۳۸۲
چناران	Ch1	روستای خیج	عسکری	تیر ۱۳۸۱
چناران	Ch2	گلمکان	عسکری	مرداد ۱۳۸۲
چناران	Ch3	گلمکان	عسکری	تیر ۱۳۸۲
کاشمر	Ka1	مرکزی	عسکری	تیر ۱۳۸۲
کاشمر	Ka2	مرکزی	عسکری	تیر ۱۳۸۲
کاشمر	Ka3	خلیل آباد	کشمشی	شهریور۱۳۸۲
کاشمر	Ka4	خلیل آباد	پیکامی	تیر ۱۳۸۲
کاشمر	Ka5	خلیل آباد	پیکامی	مرداد ۱۳۸۲
چناران	Ch4	مرکزی	عسکری	مرداد ۱۳۸۲
مشهد	Ma5	طرقبه	شاهرودی	مرداد ۱۳۸۲
سبزوار	Sab2	جوین	عسکری	مرداد ۱۳۸۲
فاروج	Fa1	مرکزی	عسکری	تیر ۱۳۸۲
فاروج	Fa2	مرکزی	عسکری	تیر ۱۳۸۲
فاروج	Fa3	مرکزی	کشمشی	مرداد ۱۳۸۲
فاروج	Fa4	مرکزی	فخری	مرداد ۱۳۸۱
نیشابور	Nish1	دیزباد	فخری	مرداد ۱۳۸۲
نیشابور	Nish2	دیزباد	فخری	مرداد ۱۳۸۲
تربت حیدریه	Toh1	بخش مرکزی	عسکری	شهریور ۱۳۸۲
تربت حیدریه	Toh2	فیض آباد	عسکری	شهریور ۱۳۸۲
گناباد	Gon1	مرکزی	عسکری	مرداد ۱۳۸۲
گناباد	Gon2	روستای بیلند	عسکری	مرداد ۱۳۸۲
سبزوار	Sab1	جوین	عسکری	تیر ۱۳۸۲
شیروان	Shi1	بخش حاجی آباد	کشمشی	خرداد ۱۳۸۱
شیروان	Shi2	بخش مرکزی	فخری	تیر ۱۳۸۱

Archive of SID

www.SID.ir

جدول(۲) کد و توالی ۲۲ آغازگر استفاده شده دراین تحقیق، همراه با تعداد کل بندهای RAPD و تعداد بندهای پلی مورفیک DNA به دست آمده بر اساس تکنیک RAPD-PCR

کد آغازگر	توالی	تعداد باندها	مورفیک تعداد بندهای پلی
OPA 9	GGGTAACGCC	9	5
OPA 20	GTTGCGATCC	7	4
OPC 8	TGGACCGGTG	6	2
OPC 10	GACGGATCAG	4	2
OPC 15	GACGGATCAG	5	0
OPE 7	AGATGCAGCC	9	4
OPF 5	CCGAATTCCC	1	1
OPI 14	TGACGGCGGT	3	3
OPJ 1	CCCGGCATAA	9	3
OPJ 18	TGGTCGCAGA	8	4
OPJ 19	GGACACCACT	7	2
OPJ 20	AAGCGGCCTC	4	1
OPP 3	CTGATACGCC	3	0
OPP 6	GTGGGCTGAC	8	3
OPP 7	GTCCATGCCA	5	2
OPQ 6	GAGCGCCTTG	3	3
OPS 17	TGGGGACCAC	4	2
OPU 6	ACCTTTGCGG	7	4
OPU 12	TCACCAGGCA	6	4
OPU 19	GTCAGTGCGG	9	3
OPU 20	ACAGCCCCCA	5	3
OPJ20	ACGAGGGACT	4	2

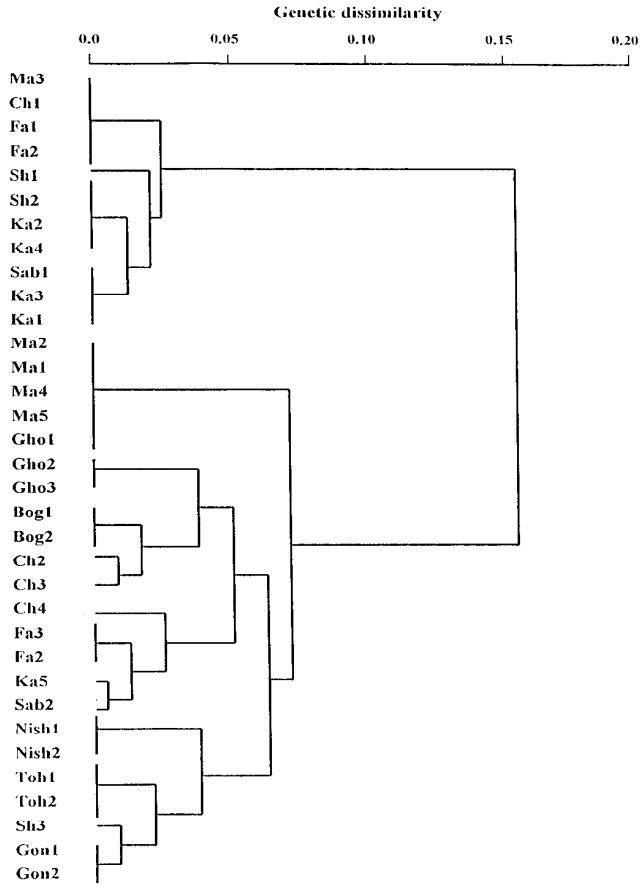
جدایه‌های جمع آوری شده در خرداد ماه و تیرماه الگوی RAPD خیلی متفاوتی با نمونه هایی که در مرداد ماه یا شهریور ماه جمع آوری شده بودند نداشتند. این اطلاعات نشان می‌دهند که در موستانهایی که نمونه گیری انجام شده است تغییرات ژنتیکی یا جابه جایی ژنتیکی بین جدایه‌ها اتفاق می‌افتد و تقریبا" جمعیت یکسانی از قارچ در موستانها وجوددارد. این جدایه‌ها احتمالا نماینده بخش زیادی از جمعیت سفیدک سطحی مو درطول فصل هستند. ماتریکس شباهت که ازاین اطلاعات به دست آمد، نشان داد که سطح تنوع کمی درمیان ۳۴ جدایه مورد بررسی وجود دارد (شکل۱). چهار جدایه بیشترین اختلاف را براساس نشانگرهای RAPD (جدایه‌های مشهد۱، نیشابور۲، چناران۱ و قوچان۲) نشان دادند ضریب دایس شباهت برای این ۴ جدایه ۸۸٪بود.

بحث

در سالهای اخیر با پیشرفت روشهای مولکولی و امکان مطالعه دقیق میکروارگانیسمها، ابزار لازم برای شناسایی تنوع ژنتیکی دربین افراد یک گونه فراهم شده است و بررسی تنوع ژنتیکی *U. necator* قارچ عامل بیماری سفیدک سطحی مو به علت اهمیتی که در ایجاد بیماری روی ارقام مختلف مو دارد ازاین قافله دور نمانده است و در بعضی از نقاط دنیا موضوع تحقیقات مختلف مولکولی بوده است (۳،۴،۵،۶،۹،۲۰،۲۱). در این تحقیق از روش RAPD-PCR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی *U. necator* عامل بیماری سفیدک سطحی مو در استان خراسان استفاده شد. تاکنون از روشهای RAPD-PCR و RFLP به منظور بررسی تنوع ژنتیکی این گونه قارچی استفاده شده است. نتایج به دست آمده از بکارگیری هر دو روش نشان دهنده نتایج مشابهی است که دقت و کارایی کافی هردوی این روشهای مولکولی را در بررسی تنوع ژنتیکی این گونه قارچی نشان می‌دهد(۳،۴،۹). در مطالعه حاضر سطح پائینی از تنوع ژنتیکی *U. necator* توسط تکنیک RAPD مشخص گردید پائین بودن سطح تنوع ژنتیکی در بین قارچهای بیماری زای گیاهی بر اساس این تکنیک توسط محققین دیگر نیز دیده

Archive of SID

www.SID.ir



شکل(۱) فنوگرام ایجاد شده از آنالیز خوشه‌ای اطلاعات RAPD به دست آمده از ۳۴جدایه *U. necator* با استفاده از روش UPGMA

شده است. (۵،۲۲،۱۹،۱۷). در همین ارتباط حتی مقدار پلی مورفیسم کمتری (تقریبا" شباهت ۹۵٪) توسط دلیه وهمکاران (۳) در بین ۱۳ جدایه *U. necator* نسبت به مطالعه حاضر دیده شده است. در این بررسی ۳۴ جدایه جمع آوری شده در دو گروه مشخص دسته بندی شدند (شکل۱) تمامی جدایه‌های جمع آوری شده از مرداد ماه تا شهریور ماه در یک گروه و جدایه‌های جمع آوری شده در یک باغ در کلادهای یکسان یا در کلادهای مجاور گروه بندی شدند. این موضوع با نتایج محققین قبلی موافقت دارد (۳،۶) و تمامی جدایه‌های جمع آوری شده در خرداد و تیرماه نیز در گروه یکسانی قرارگرفتند اما ازنظر ژنتیکی از جدایه‌های گروه دوم خیلی متمایز نبودند و علی رغم منشاء جغرافیایی گوناگون، تعداد بندهای پلی مورفیک خیلی کمی داشتند همچنین آنالیز الگوی باندی ضریب شباهت از اطلاعات به دست آمده از گروهI و گروه II با گروههای فنتیکی A وBکه قبلا" توسط استومرو همکاران (۲۰) و دلیه و همکاران(۶،۳) در مورد *U. necator* گزارش شده بود مطابقت دارد. نتایج تحقیقات در نقاط مختلف دنیا مؤید این نکته است که زمستان گذرانی عامل بیماری سفیدک سطحی مو به صورت آسکوکارپ می‌باشد (۲،۱۰،۱۲) در همین رابطه بررسی نحوه زمستان گذرانی *U. nectar* در استان خراسان مشخص کرد که زمستان گذرانی این قارچ

Archive

www.SID.ir

بـه صـورت کلیستوتسـیوم مـی‌باشـد و معلـوم گردیـد کـه رهاسازی آسکوسپورها از مرحلهٔ بازشدن جوانه‌ها تـا تشـکیل گـل در مـو ادامـه دارد و اوج رهاسـازی آسکوسـپورها بـین اسفند تا اردیبهشت مـاه اتفـاق مـی‌افتـد (۲) بنـابراین احتمـال دارد تمامی این جدایه‌هـا از آسکوسـپورهای رهاسـازی شـده در ابتـدای فصـل منشـاء گرفتـه باشـند و جابـه جـایی بـین جدایه‌های جمعیت گروه اول و دوم در موستانها اتفاق بیافتـد که به نظر می‌رسد به علت تفـاوت در توانـایی بیمـاری زایـی این جدایه‌ها باشد. عدم حضور جدایه‌های نمونه برداری شده در طی خرداد و تیر ماه در مرداد و شهریور ماه نشان می‌دهـد کـه ایـن جدایـه‌هـا نماینـده نسـبت پـائینی از جمعیـت عامـل بیمـاری سـفیدک سـطحی مـو درایـن زمـان مـی‌باشـند یـا این گـروه رشـد و فعالیـت زیـادی در موسـتانها ندارنـد و یـا احتمالا" این دو گروه متعلق به تیپهای جفت گیـری سـازگار (Mating Type) مثبـت و منفـی هسـتندو عـدم دسترسـی بـه تعداد پائین مارکرهـای RAPD تفکیـک کننـده جدایـه‌هـای گروه اول از گروه دوم می‌توانـد دلیلـی بـر وجـود نـوترکیبی بالا بین جدایه‌های این گروههاباشـد. اسـتومر واسـکات (۲۱) وجود نوترکیبی جنسی و تفرق ژنتیکی، بـین نتـاج حاصـل از آسکوسپورهای *U. necator* و تشـکیل ژنوتیپهـای جدیـد را اثبات می‌کنند و نشان می‌دهند که تولید مثل جنسی می‌توانـد بین جدایه‌های مختلف نماینـدگان گروههـای فنتیکـی اتفـاق بیفتد و منجر به تولید ژنوتیپهای جدید شود. این محققین هـم چنـین حضـور جدایـه‌هـای نماینـده هـر دو گـروه فنتیکـی را دربین جمعیتهـای *U. necator* در موسـتانهای اسـترالیا نشـان مـی‌دهنـد. همچنـین دلیـه و همکـاران (۴)نشـان دادندکـه جدایه‌های هنـدی ایـن قـارچ در دو گـروه ژنتیکـی مشـخص قرارمی گیرند، این محققین معتقدند وجود دو گروه مشخص ژنتیکی درهند ممکن است به عوامل محیطی وابسته باشد. در آب و هوای گرم جنوب هند مو بـه حالـت خـواب نمـی رود بنابر این قارچ عامل بیماری نیاز به زمسـتان گـذرانی نـدارد و شوتها و برگها به طور دائم درحـال رشـد هسـتند و سـفیدک سطحی مو ممکن است در شوتها یا جوانه‌ها زمستان گـذرانی کند.

مطالعـات نشـان داده اسـت کـه عامـل مهـم دیگـر در تغییـر ساختمان جمعیت قارچهـا ممکـن اسـت مهـاجرت باشـد. امـا هـیچ گونـه همبسـتگی بـین مارکرهـای مولکـولی و منشـاء جغرافیایی جدایه‌ها در این تحقیق به دست نیامد این موضـوع نشان می‌دهـد کـه تمـامی جدایـه‌هـای مـورد بررسـی دراین تحقیـق شـباهت ژنتیکـی زیـادی دارنـد و فاصـله جغرافیـایی عاملی در تمایز ژنتیکی جدایه‌ها نیست. هرچند توانایی انتشار گونه‌های قارچی مولد سفیدک سطحی توسط باد مدتها قبـل شناخته شده اسـت(۱۳،۲۳)امـا هـیچ گونـه اطلاعـاتی دراین زمینه درمورد *U. necator* وجود ندارد. به طـور کلـی نتـایج این مطالعه نشان مـی‌دهـد کـه نشـانگرهای مولکـولی هماننـد RAPDمـی تواننـد شـناخت مـا را از اکولـوژی و ژنتیـک جمعیت *U. necator* افزایش دهند و امکان بررسی و مطالعـه در زمینـه تولیـد مثـل جنسـی و رفتـار انتشـاری ایـن گونـه را بدهند. بررسی خویشاوندی ژنتیکی جدایـه‌هـای *U. necator* توسط ضریب شباهت مجموعه جدایه‌های جمع آوری شـده دراین تحقیـق نشـان داد کـه تغییـر ژنتیکـی در بـین و داخـل نـواحی موکـاری اسـتان وجـود دارد(شـکل۱). جدایـه‌هـای گروه I تا حد زیادی متغیر بودند و ارتباط بین ایـن جدایـه‌هـا پیچیده بود. برخلاف نتایج دلیه و همکاران (۴) مطالعه حاضر هـیچ گـروه بنـدی روشـنی از جدایـه‌هـا را بـر اسـاس نـواحی جغرافیایی که جدایه‌ها از این مناطق جمع آوری شـده بودنـد نشان نداد و تفاوت کمـی در بـین جدایـه‌هـای گـروه IIدیـده شد. توزیع وسیع جدایه هایی بـا شـباهت ژنتیکـی زیـاد نشـان می‌دهد که احتمـالا جریـان ژنـی(Gene Flow) بـین نـواحی جغرافیایی اتفاق می‌افتد که ممکن است توسـط بـاد یـا جابـه جـایی مـواد گیـاهی ناشـی از موهـای آلـوده باشـد. هـر چنـد روشـهای RFLP و روشـهای دیگـر مبتنـی بـر PCR، تنـوع

Archive of SID

www.SID.ir

ژنتیکی بیشتری را دربین جدایه‌های این قارچ نشان می‌دهد (۹،۲۰) اما وجود دو گروه فنتیکی مشخص در این بررسی، استفاده از نشانگرهای RAPD را در بررسی تنوع ژنتیکی قارچها، رد نمی کند و نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نیاز به مطالعه بیشتری برای شفاف سازی نقش تولید مثل جنسی و جریان ژنی در ساختمان جمعیت *U. necator* در استان خراسان و ایران می‌باشد. این مطالعات شناخت ما را از دینامیک جمعیت *U. necator* و همکاری در توسعهٔ راهبردهایی برای کنترل پایدار بیماری بیشتر خواهد ساخت.

سپاسگزاری

این تحقیق از محل اعتبارات قطب علمی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران ودر مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان اجرا شده است و نگارندگان بدین وسیله از مساعدتهای مسئولین دانشکده کشاورزی و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان قدردانی می‌نمایند.

منابع

۱. بهداد، ا. ۱۳۶۹. بیماریهای درختان میوه ایران. بیماری سفیدک سطحی انگور170صفحه.

۲. حاجیان شهری. م.، ج. زاد.، ع. شریفی تهرانی.، م. اخوت و ع. صفر نژاد. ۱۳۸۴. بررسی نقش کلیستوتسیوم در زمستانگذرانی *Uncinula necator* عامل بیماری سفیدک سطحی مو در استان خراسان. مجله عاوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان. سال نهم شماره اول صفحه ۲۲۵-۲۳۹.

3. Délye, C., Laigret, F., and Corio-Costet, M. F. 1995. A RAPD assay for straintyping of the biotrophic grape powderymildew fungus *Uncinula necator* using DNA extracted from the mycelium. Experimental Mycology 19: 234 –23.
4. Délye, C., Laigret, F., and Corio- Costet, M-F. 1997. RAPD analysis provides insightinto the biology and epidemiology of *Uncinula necator*. Phytopathology 87: 670-677.
5. Délye, C., Laigret, F., and Corio-Costet, M. F. 1997. New tools for studying epidemiology and resistance of grape powdery mildew to DMI fungicides. Pestic. Sci.51: 309-314.
6. Délye, C., and Corio-Costet, M. F. 1998. Origin of primary infections of grape by *Uncinula necator*: RAPD analysis discriminates two biotypes. Mycol. Res. 102: 283-288.
7. Evans, K. J., Whisson. D. L., and Scott,E.S. 1996. An experimental system for characterizing isolates of *Uncinula necator*. Mycol. Res. 100 (6): 675-680.
8. Evans, K. J. E. S. Scottand Whisson. D. L. 1997. Heterothallism among South Australian clonal lines of *Uncinula necator*. Australasian Plant Pathology 26:10-26.
9. Evans, K. J., Whisson, D. L., Stummer,B. E., and Scott, E. S. 1997. DNA markers identify variation in Australian populations of*Uncinula necator*. Mycol. Res. 101: 923- 932.
10. Gadoury, D. M., and Pearson, R. C. 1988. Initiation, development, dispersal, and survival of*Uncinula necator* in New York vineyards.Phytopathology 78:1413-1421.
11. Gadoury, D. M., andPearson, R. C. 1990. Ascocarp dehiscence andascosporedischarge in *Uncinula necator*. Phytopathology 80: 393-401.
12. Gee, L. M., Stummer, B. E., Gadoury, D. M., Biggins, L. T.and Scott, E. S. 2000. Maturation of cleistothecia of *Uncinula necator* (powdery mildew) and release of ascospores in southern Australia. Australian Journal of Grape *and* Wine Research 6:13-20.
13. Hermansen, J. E., Torp, U.,andPrahm, L. P. 1978. Studies of transport of spors of cereal mildew and Rust fungi across. NorthSea. Grana 17:41-46.
14. Lee, S. B., Milgroom, M. G., and Taylor, J. W. 1988. A rapid , high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from Fungi. Furgal Genetic News letter 35:23-34.
15. Murashighe, T., and Skoog, k. 1962. A revised medium forrapid growth and bioassays with tobblacco tissue cultures. Physiologia plantarum 15:473-497.

Archive of SID

www.SID.ir

16. Nei, M., and Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms or restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5269-5273.
17. Ouellet, T., and Seirert, K. A. 1993. Genetic charactrization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. Phytopathology83: 1003-1007.
18. Pearson, R. C.,andGadoury, D. M. 1987. Cleistothecia, the source of primary inoculum for grape powdery mildew in New York.Phytopathology 77: 1509-1514.
19. Sreenivasaprasad, S., Brown, A. E., and Mills, P. R. 1993. Coffe berry disease pathogen in Aferica: Genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gleosporioides.* Mycol. Res. 97: 995-1000.
20. Stummer, B. E., Zanker, T., Scott, E. S.,and Whisson, D. L. 2000. Genetic diversity in populations of *Uncinula necator*: comparison of RFLP- and PCR- based approaches. Mycol. Res. 104: 44-52.
21. Stummer, B. E., and Scott, E. S. 2003. Detection ofnovel genotypes in progeny from a controlled cross between isolates of *Uncinula necator*belonging to distinct phenetic groups. AustralasianPlant Pathology 32:213-218.
22. Van Der Vlugt-Bergmans, C. J. B., Brandwagt, B. F., Vant Klooster, J. W.,Wagemkers, and Van Kan J. A. l. 1993. Genetic variation and segregationofDNA polymorphismsin*Botrytis cinerea*. Mycol. Res 97: 1193-1200.
23. Yarwood, C. E. 1978. History and taxonomy of powdery Mildews. In: Spencer, D. M.(ed) the powdery Mildews (pp 1-37) Academic Press, London.

Archive of SID

www.SID.ir

Genetic variation of *Uncinula necator* (Schw.) Burr. causal agent of Grape Powdery Mildew by using RAPD molecular markers in Khorassan Province

M.Hajianshahri[*] - J. Zad - A. Sharifi Tehrani -S. M. Okhovat - AND A. Safarnejad[1]

Abstract

Thirty-four isolates of *U. necator* were taken from diseased grapes from different vineyards in Khorassan province. Sample were collected in June, July and August 2003 from the same plants. Young plant leaves reproduced through micro propagation method were used to obtain single spore isolates. A minimum of 10 leaves were used to produce fungi biomass. Amount of fungi biomass production 12 days after inoculation were changed in a range of 6 to 38 mg depending on concerned isolates. DNA from these isolates were extracted and genetic variation among all isolates were assessed with 22 primersby usingRAPD technique. Cluster analysis based on the 126 RAPD fragments obtained using 22 primers revealed two very distinct groups, one group containing 11 isolates from the first sampling, the second group containing all the remaining isolates. Isolates clustered in the first group displayed 47 RAPD fragments specific to them. These isolates did not exhibit 79 RAPD fragments presentin all other isolates. Molecular data suggested that isolates clustering in two groups represent two different biotypes of *U. necator*, which are likely to be genetically isolated.

Key words: Powdery mildew, Grape, Genetic variation, Khorassan, RAPD-PCR

Archive of SID

* Corresponding author Email:Mhagi52570@yahoo.com

1.Staff Members Agricultural Resources Research Center Khorassan Razavi Province&Staff Members, University College of Agriculture & Natural Resources , University of Tehran, Karaj

www.SID.ir