

بررسی تنوع ژنتیکی *Wilsonomyces carpophilus* عامل لکه غربالی هسته‌داران در استان خراسان رضوی با استفاده از نشانگر rep-PCR

رضا برازنده آق کاریز^۱ - ناصر پنجه که^{۲*} - محمد حاجیان شهری^۳ - سید کاظم صباغ^۴ - محمود بهزادی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۶/۱۶

چکیده

بیماری لکه غربالی درختان میوه هسته‌دار ناشی از *Wilsonomyces carpophilus* باعث ضعیف شدن درختان آلوده و کاهش کمیت و کیفیت محصول در اغلب مناطق جهان می‌شود. این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی این قارچ در استان خراسان رضوی با استفاده از نشانگر مولکولی rep-PCR انجام شد. از باغات هلو، شلیل، آلو، زردآلو و گیلاس شهرستان‌های قوچان، طرقله-شاندیز، چناران، نیشابور، کلات، تربت حیدریه و مشهد نمونه برداری شد. برگ‌ها، سرشاخه‌ها و میوه‌های آلوده به آزمایشگاه منتقل شدند. قطعاتی از حد-فاصل یافت آلوده و سالم جدا و پس از ضدعفونی سطحی در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت‌های PDA، مالت‌آگار و آب‌آگار کشت و در انکوباتور با دماهای ۱۸، ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. قارچ‌های جدا شده پس از خالص‌سازی شناسایی شدند. تنوع ژنتیکی ۲۰ جدایه قارچی جدا سازی شده از درختان میوه هسته‌دار شهرستان‌های مختلف استان تعیین شد. تکثیر DNA ژنومی با استفاده از آغازگرهای ERIC2، BOX، AIR، ERIC1R، REP2-I، REP1R-I صورت گرفت. در مجموع ۳۹ باند در محدوده ۱۰۰ تا ۵۰۰۰ جفت‌باز تشکیل شد که از این تعداد ۳۸ باند چند شکلی را نشان دادند. ماتریکس تشابه بین جدایه‌ها بر اساس ضریب جاکارد محاسبه و تجزیه کلاستر و رسم دندروگرام بر اساس UPGMA با استفاده از نرم افزار NTSYS.PC2.0 انجام شد. نتایج نشان داد که جدایه‌ها در سطح تشابه ۶۹ درصد به ۱۲ دودمان کلونی تقسیم شدند. با این نشانگر جدایه‌های قارچی شهرستان‌های کلات و چناران از نظر جغرافیایی و تا حدودی جدایه‌های قارچی آلو از نظر میزبانی از سایر جدایه‌های قارچی جدا شدند. همچنین با این نشانگر اکثر جدایه‌های قارچی زردآلو از سایر گروه‌ها جدا شدند.

واژه‌های کلیدی: بیماری لکه غربالی، نشانگر مولکولی

مقدمه

(۱). با توجه به بالا بودن سطح زیر کشت گونه‌های مختلف درختان میوه هسته‌دار در ایران و شرایط اقلیمی خاص ایران زمینه برای همه گیر شدن این بیماری فراهم می‌باشد. این بیماری خسارت نسبتاً زیادی به انواع درختان میوه هسته‌دار استان خراسان رضوی وارد می‌سازد (۶ و ۲۴). عامل بیماری قارچ *Wilsonomyces carpophilus* (Lev.) Adaskaveg, Ogawa & Butler (= *Stigmina carpophila* (Lev.) M.B. Ellis and *Coryneum beijerinckii* Oud) می‌باشد. این قارچ در مرحله غیر جنسی تولید اسپورودوکیم می‌کند (۱). این بیماری بیشترین خسارت را در شرایط آب و هوایی خنک و مرطوب به خصوص در بهار (و هر زمان دیگر که آب و هوای مرطوب طولانی مدت وجود داشته باشد) وارد می‌کند (۵). یکی از راهکارهای مهم مدیریت هر بیماری گیاهی استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد و برای استفاده از ارقام مقاوم به بیماری، شناخت تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ عامل بیماری ضروری است. از این رو در این تحقیق از تکنیک rep-PCR به همراه آغازگرهای BOX، ERIC و REP به منظور انگشت نگاری DNA جدایه‌های قارچ عامل لکه غربالی درختان میوه هسته‌دار و تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت آن در استان خراسان رضوی استفاده گردید. تکنیک rep-PCR که بر

بیماری لکه غربالی (shot hole) درختان میوه هسته‌دار از مهم‌ترین و خسارت‌زاترین بیماری‌های درختان میوه هسته‌دار در اغلب مناطق جهان بخصوص نواحی نیمه خشک است (۱ و ۱۸). عامل بیماری به تمامی درختان میوه هسته‌دار از جمله هلو، شلیل، زردآلو، آلبالو، آلو، بادام و گیلاس و همچنین هسته داران زینتی و درختان گلابی، سیب و زالزالک حمله می‌کند (۲، ۳ و ۵). این بیماری باعث ضعیف شدن درختان آلوده و کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌شود

۱ و ۲- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

*- نویسنده مسئول: (Email: naserpanjehkeh@uoz.ac.ir)

۳- استادیار پژوهشی، بخش گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی

۴- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه یزد

۵- کارشناس ارشد سازمان جهاد کشاورزی خراسان رضوی

DOI: 10.22067/jpp.v31i1.36386

شدند و روی محیط کشت PDA کشت داده شدند. بعضی از نمونه‌ها به جای ضد عفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم با پنبه‌ی آغشته به الکل ۵۰ درصد و ۷۰ درصد ضد عفونی سطحی شدند. کشت‌های قارچی به انکوباتور با دماهای ۱۸، ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. خالص‌سازی به روش تک اسپور کردن صورت گرفت.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از کشت ۱۰ روزه قارچ که روی محیط کشت PDA در تشک‌های پتری کشت داده شده بود، استفاده شد. استخراج DNA با استفاده از روش موری و تامسون (۱۷) اصلاح شده توسط روجرز و همکاران (۲۰) و کیم و همکاران (۱۰) انجام شد. به منظور مشاهده وجود یا عدم وجود DNA و تعیین کیفیت و یکپارچگی آن، از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد.

انگشت نگاری DNA با استفاده از نشانگر rep-PCR

برای تکثیر قطعات DNA جهت بررسی تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری سه آغازگر ERIC، REP و BOX چند نوکلئوتیدی (جدول ۱) مورد استفاده قرار گرفتند. آغازگرهای ERIC از شرکت سینا ژن و BOX و REP از شرکت دنا زیست آسیا تهیه شدند. تکثیر قطعات DNA با ترموسایکلر مدل XP cycler Bioer در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در واکنش PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰x، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase معادل یک واحد، ۱ میکرولیتر DNA نمونه با رقت $\frac{1}{10}$ از DNA استخراج شده و

در نهایت آب مقطر دو بار تقطیر به مقدار ۱۶/۸ میکرولیتر برای آغازگر REP و ERIC و ۱۷/۸ میکرولیتر برای آغازگر BOX انجام گرفت. به عنوان کنترل منفی، در یک میکروتیوپ به جای DNA الگو از آب مقطر سترون استفاده شد. برای برنامه حرارتی واکنش PCR از پروتوکول‌های مطلبی و همکاران (۱۶)، جلالی و همکاران (۷)، رندو و همکاران (۱۹) و جدری سزکا و همکاران (۸) با اندکی تغییرات استفاده شد. برنامه حرارتی واکنش PCR برای آغازگرهای ERIC و BOX شامل: مرحله اول: واسرشت سازی اولیه در دمای $95^{\circ}C$ به مدت ۴ دقیقه، مرحله دوم: در یک برنامه حرارتی $40^{\circ}C$ چرخه ای که هر چرخه شامل یک فاز واسرشت در $95^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه، فاز اتصال و هیبرید شدن آغازگرها در دمای $50^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه و یک فاز گسترش در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۳ دقیقه بود. مرحله سوم: گسترش نهایی در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه بود. برنامه حرارتی واکنش PCR برای آغازگر REP همانند دو آغازگر دیگر بود،

مبنای توالی‌های تکرار شونده است به میزان زیادی قابل اعتماد، تکرارپذیر و سریع بوده و قدرت تمایز آن بسیار عالی است (۲۳). این تکنیک از توانایی تفکیک تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بزرگی از میکروارگانیزم‌ها به خصوص وقتی با تجزیه و تحلیل‌های آماری و کامپیوتری همراه باشد، برخوردار می‌باشد (۱۳). آغازگرهای BOX، ERIC و REP توالی‌های بین توالی‌های تکرار شونده در پروکاریوت‌ها و برخی از ژنوم‌های قارچی را هم با موفقیت تکثیر می‌کنند (۲۳) و برای مطالعه تنوع در سطوح بین و یا درون گونه‌های قارچ‌هایی مانند *Penicillium* (۱۹)، *Leptosphaeria maculans* (۸)، *Rhizoctonia solani* (۲۱) و *Drechslera avenae* (۱۵) استفاده شده‌اند. در ایران نیز مطالعاتی بر روی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ‌های مختلف با استفاده از نشانگر rep-PCR انجام شده است. به عنوان مثال تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *sclerotinia sclerotiorum* (۹)، *Marcrophomina phaseolina* (۷)، *Mycosphaerella graminicola* (۱۲) و *Monosporascus cannonballus* (۴) با این تکنیک صورت گرفته است. هدف از انجام این تحقیق، مطالعه در زمینه تنوع ژنتیکی جدایه‌های *W. carpophilus* جمع‌آوری شده از شهرستان‌های مختلف استان خراسان رضوی با استفاده از نشانگر rep-PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری در طی سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ از باغات درختان میوه هسته دار شهرستان‌های قوچان (آق‌کاریز و علی‌آباد)، طرقله - شاندیز، چناران (اخلمد، کاهو و دولت‌آباد)، نیشابور (بوژان و فوشنجان)، کلات (زاوین و سررود)، تربت حیدریه (بایگ) و مشهد (باغات آستان قدس رضوی و باغات اطراف مشهد) از استان خراسان رضوی صورت گرفت. نمونه برداری از درختان هلو، شلیل، آلو، زردآلو و گیلاس انجام شد که به طور تصادفی از نقاط مختلف هر باغ و از تمام قسمتهای یک درخت شامل برگ‌ها، سرشاخه‌ها و میوه‌های آلوده که نشانه‌های غربالی را نشان می‌دادند صورت گرفت.

جداسازی عوامل قارچی

با استفاده از تکنیک‌های کلایمسوا و پراسیل (۱۱) و مهتا (۱۴) از حد فاصل بافت سالم و آلوده‌ی هر نمونه با اسکالپل، برش‌هایی به اندازه‌ی ۲-۳ میلی‌متر از برگ، میوه و سرشاخه تهیه شد و با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۱ تا ۳ دقیقه بسته به ظرافت یا ضخامت بافت، ضد عفونی سطحی شدند. سپس، سه بار با آب مقطر سترون، جهت از بین بردن باقیمانده ماده ضد عفونی کننده در بافت گیاه شستشو داده شدند و در لابه‌لای چند کاغذ صافی سترون خشک

با این تفاوت که در مرحله اتصال از دمای °C ۴۰ استفاده شد. برای مشاهده محصولات حاصل از PCR، الکتروفورز محصولات تکثیر شده در ژل آگارز ۱/۳ درصد که توسط محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده بود انجام شد. برای امتیازدهی الگوی باندهای هر ژل، وجود یا عدم وجود هر باند DNA در یک مکان خاص برای هر نمونه به صورت ۱ و صفر در جدول داده‌ها (data matrix) در نرم‌افزار

Microsoft Excel 2010 ثبت شد. بر اساس ماتریکس شباهت که با استفاده از ضریب تشابه جاکارد به دست آمده بود، تجزیه تحلیل خوشه‌ای به روش unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) و نرم افزار NTSYS PC 2.0 انجام شد و دندروگرام مربوطه رسم گردید.

جدول ۱- توالی آغازگرهای متقارن خارج ژنی تکراری مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمرز

Table 1- Sequence of the rep-PCR primers

| نام آغازگر Primer name | توالی آغازگر Nucleotide sequence | تعداد نوکلئوتید Number of Nucleotide |
|---------------------------|-------------------------------------|---|
| BOX AIR | 5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG- 3' | 22 |
| ERIC2 Forward | 5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG- 3' | 22 |
| ERIC1R Reverse | 5'- ATGTAAGCTCCTGGGGTTAC- 3' | 21 |
| REP2-I Forward | 5'- ICGICTTATCIGGCCTAC- 3' | 18 |
| REP1R-I Reverse | 5'- IICGICGICATCIGGC- 3' | 17 |

در مجموع ۳۹ باند تکثیر شد که از این تعداد، ۳۸ باند (۹۷/۵ درصد) چند شکلی نشان دادند. وزن مولکولی قطعات DNA تکثیر شده در محدوده ۱۰۰ تا ۵۰۰۰ جفت باز بود.

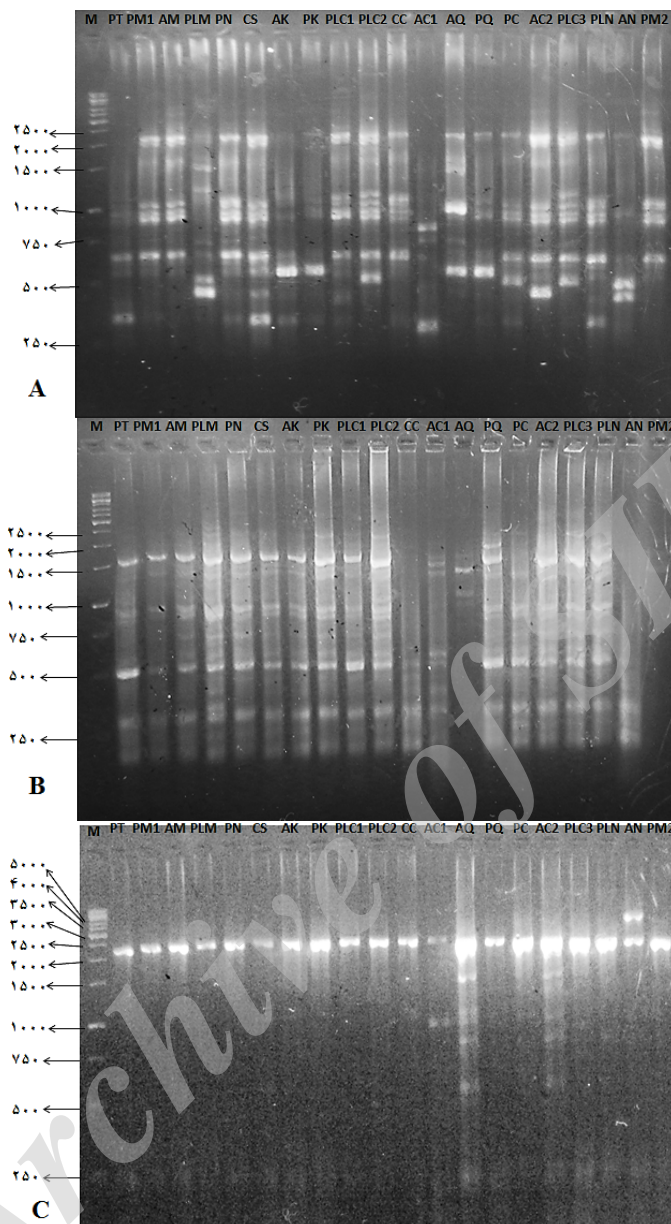
نتایج

با جداسازی عامل بیماری از روی میوه‌ها، برگ‌ها و سرشاخه‌ها، ۲۰ جدایه از قارچ *W. carpophilus* به دست آمد (جدول ۲).

جدول ۲- جدایه‌های *Wilsonomyces carpophilus* جمع آوری شده از مناطق مختلف استان خراسان رضوی

Table 2- Isolates of *W. carpophilus* obtained from different regions of Khorasan Razavi province

| ردیف Row | میزبان Host | اندام گیاه Plant organ | محل نمونه برداری Sampling site | کد جدایه Isolate Code |
|-------------|------------------|---------------------------|--|--------------------------|
| 1 | هلو (Peach) | میوه (Fruit) | طرقبه (Torghabeh) | PT |
| 2 | هلو (Peach) | میوه (Fruit) | باغات اطراف مشهد (Mashhad) | PM1 |
| 3 | زردآلو (Apricot) | میوه (Fruit) | باغات اطراف مشهد (Mashhad) | AM |
| 4 | آلو (Plum) | برگ (Leaf) | مشهد - باغات آستان قدس رضوی (Astan Ghods Razavi) | PIM |
| 5 | هلو (Peach) | میوه (Fruit) | نیشابور - فوشنجان (Nyshabour-Fooshenjan) | PN |
| 6 | گیلاس (Cherry) | برگ (Leaf) | شاندیز (Shandiz) | CS |
| 7 | زردآلو (Apricot) | برگ (Leaf) | کلات - روستای زاوین (Kalat-Zavin) | AK |
| 8 | هلو (Peach) | میوه (Fruit) | کلات - روستای زاوین (Kalat-Zavin) | PK |
| 9 | آلو (Plum) | میوه (Fruit) | چناران - روستای کاهو (Chenaran-Kahoo) | PIC1 |
| 10 | آلو (Plum) | برگ (Leaf) | چناران - روستای کاهو (Chenaran-Kahoo) | PIC2 |
| 11 | گیلاس (Cherry) | برگ (Leaf) | چناران - روستای کاهو (Chenaran-Kahoo) | CC |
| 12 | زردآلو (Apricot) | برگ (Leaf) | چناران - روستای کاهو (Chenaran-Kahoo) | AC1 |
| 13 | زردآلو (Apricot) | برگ (Leaf) | قوچان - روستای آق کاریز (Quchan) | AQ |
| 14 | هلو (Peach) | برگ (Leaf) | قوچان - روستای آق کاریز (Quchan) | PQ |
| 15 | هلو (Peach) | برگ (Leaf) | چناران - اخلمد (Chnaran-Akhlamad) | PC |
| 16 | زردآلو (Apricot) | برگ (Leaf) | چناران - اخلمد (Chnaran-Akhlamad) | AC2 |
| 17 | آلو (Plum) | برگ (Leaf) | چناران - اخلمد (Chnaran-Akhlamad) | PIC3 |
| 18 | آلو (Plum) | برگ (Leaf) | نیشابور - بوژان (Nyshabour-Bouzhan) | PIN |
| 19 | زردآلو (Apricot) | میوه (Fruit) | نیشابور - بوژان (Nyshabour-Bouzhan) | AN |
| 20 | هلو (Peach) | برگ (Leaf) | مشهد - باغات آستان قدس رضوی (Astan Ghods Razavi) | PM2 |



شکل ۱- الگوی بانندی تکثیر شده از DNA جدایه‌های *Wilsonomyces carpophilus* با نشانگر متقارن خارج ژنی تکراری مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمرز: A: آغازگر BOX، B: آغازگر ERIC و C: آغازگر REP. در این نمودارها M بیانگر نشانگر ladder با وزن ۱ کیلو- باشد و دو حرف انگلیسی از چپ به راست به ترتیب بیانگر حرف اول نام انگلیسی درخت میوه هسته‌دار و نام شهرستان محل جمع آوری می‌باشند که عبارتند از: PT: هلو طرقله، PM1: هلو مشهد ۱، AM: زردآلو مشهد، PLM: آلو مشهد، PN: هلو نیشابور، CS: گیلاس شاندیز، AK: زردآلو کلات، PK: هلو کلات، PLC1: آلو چناران ۱، PLC2: آلو چناران ۲، CC: گیلاس چناران، AC1: زردآلو چناران ۱، AQ: زردآلو قوچان، PQ: هلو قوچان، PC: هلو چناران، AC2: زردآلو چناران ۲، PLC3: آلو چناران ۳، PLN: آلو نیشابور، AN: زردآلو نیشابور و PM2: هلو مشهد.

Fig.1. Amplified banding pattern obtained by rep-PCR marker. A: primer BOX; B: primer ERIC; and C: primer REP. M indicates ladder marker with 1-kb molecular weight and the letters from left to right indicates the first letter of the fruit name and the first letter of its origin: PT (peach of Torqabeh), PM1 (peach of Mashhad number 1), AM (apricot of Mashhad), PLM (plum of Mashhad), PN (peach of Neishabur), CS (cherry of Shandiz), AK (apricot of Kalat), PK (peach of Kalat), PLC1 (plum of Chenaran number 1), PLC2 (plum of Chenaran number 2), CC (cherry of Chenaran), AC1 (apricot of Chenaran number 1), AQ (apricot of Quchan), PQ (peach of Quchan), PC (peach of Chenaran), AC2 (apricot of Chenaran number 2), PLC3 (plum of Chenaran number 3), PLN (plum of Neishabur), AN (apricot of Neishabur), and PM2 (peach of Mashhad number 2).

و هلو قوچان (PQ) که شباهت ۷۰ درصدی با هم دارند، **گروه D**، ۳ جدایه هلو نیشابور (PN) و گیلاس شانندیز (CS) با شباهت ۸۵ درصدی و آلو نیشابور (PLN) با شباهت ۷۲ درصدی نسبت به دو جدایه دیگر قرار دارد، **گروه E**، ۴ جدایه بررگترین دودمان را دارد. در این گروه جدایه‌های آلو چناران ۲ (PLC2) و آلو چناران ۳ (PLC3) با ۸۶ درصد بیشترین شباهت و جدایه هلو چناران (PC) با ۷۰ درصد کمترین شباهت را نسبت به سایر افراد گروه دارد. این گروه از نظر جغرافیایی و میزبانی از سایر گروه‌ها جدا شده است. **گروه F**، شامل ۲ جدایه زردآلوی کلات (AK) با هلوئی کلات (PK) که شباهت ۹۴ درصدی با هم دارند. این دودمان نیز از نظر جغرافیایی از سایر گروه‌ها جدا شده است. **گروه‌های G** با جدایه زردآلو چناران ۲ (AC2)، **H** با جدایه هلو مشهد ۲ (PM2)، **I** با جدایه آلو مشهد (PLM)، **J** با جدایه زردآلو نیشابور (AN)، **K** با جدایه زردآلو چناران ۱ (AC1) و گروه **L** با جدایه زردآلو قوچان (AQ) هر کدام با یک جدایه از سایر گروه‌ها جدا شدند. با توجه به نتایج فوق، این نشانگر توانسته جدایه‌های شهرستان‌های کلات و چناران را از نظر جغرافیایی و همچنین تا حدودی جدایه‌های آلو و زردآلو را از نظر میزبانی از سایر جدایه‌ها جدا کند.

آغازگر ERIC تعداد ۱۷ باند، آغازگر BOX تعداد ۱۴ باند و آغازگر REP تعداد ۸ باند تکثیر نمودند. همچنین آغازگرهای ERIC و BOX، ۱۰۰ درصد چند شکلی نشان دادند، در حالی که آغازگر REP، ۷۸/۵ درصد چند شکلی نشان داد (شکل ۱)

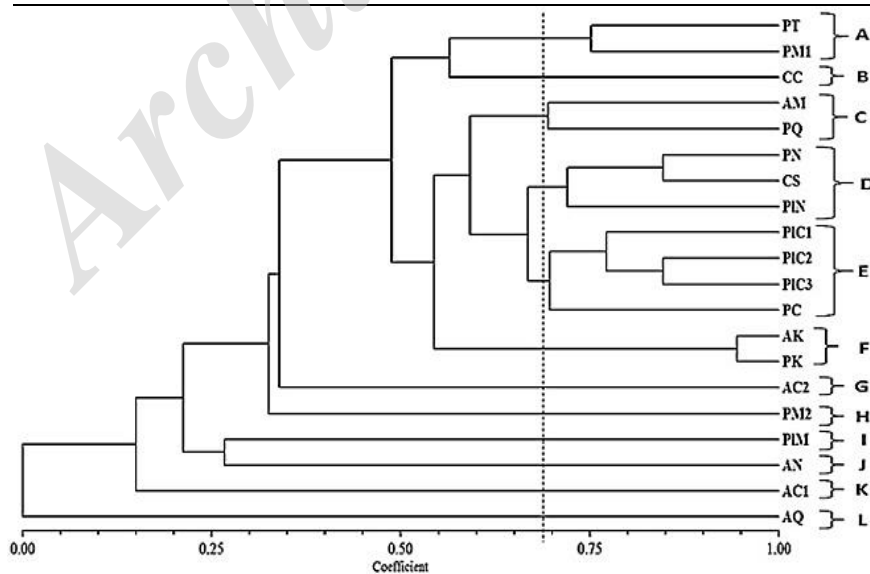
بر اساس تجزیه و تحلیل الگوهای باندهای حاصل از مجموعه آغازگرهای rep-PCR، جدایه‌های *W. carpophilus* در سطح شباهت ۶۹ درصد به ۱۲ گروه تقسیم شدند که از بالا به پایین به ترتیب با حروف انگلیسی نام گذاری شدند (شکل ۲). بیشترین شباهت را جدایه‌های *W. carpophilus* جداسازی شده از زردآلوی کلات (AK) با هلوئی کلات (PK) با ۹۴ درصد شباهت داشتند و کمترین شباهت را جدایه‌های *W. carpophilus* جداسازی شده از زردآلو قوچان (AQ)، زردآلو نیشابور (AN)، زردآلو چناران (AC)، آلو مشهد (PLM)، هلو مشهد ۲ (PM2) و گیلاس شانندیز (CC) را با سایر جدایه‌ها داشتند.

دودمان‌های کلونی

در این تحقیق ۱۲ دودمان کلونی مشخص شد که شامل: **گروه A**، شامل ۲ جدایه هلو طرقله (PT) و هلو مشهد ۱ (PM1) که شباهت ۷۵ درصدی با هم دارند، **گروه B**، در این گروه تنها جدایه گیلاس شانندیز (CC) قرار دارد، **گروه C**، شامل ۲ جدایه زردآلو مشهد (AM)

جدول ۳- تعداد کل باندها و باندهای پلی مورفیک در آغازگرهای متقارن خارج ژنی تکراری مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمرز

| ردیف | اسم آغازگر | تعداد کل باندها | باندهای چند شکلی | درصد چند شکلی |
|------|-------------|-----------------|--------------------|----------------------|
| Row | Primer name | Total bands | Polymorphism bands | Polymorphism percent |
| 1 | BOX | 14 | 14 | 100 |
| 2 | ERIC | 17 | 17 | 100 |
| 3 | REP | 8 | 7 | 78.5 |



بحث و نتیجه گیری

جدایه‌ها از لحاظ منشأ جغرافیایی از یکدیگر تفکیک شدند. بر اساس نتایج این تحقیق نشانگر rep-PCR و آغازگرهای BOX و ERIC به خوبی توانستند قطعات DNA قارچ *W. carpophilus* را تکثیر کنند. در بررسی تنوع ژنتیکی ایران با استفاده از این نشانگر و آغازگرهای BOX 1AR و ERIC 2 (۱۲) قطعاتی از DNA تکثیر شد. با توجه به تنوع ژنتیکی بالای مشاهده شده در جمعیت این قارچ، اهتمام به کشت ارقامی با مقاومت نسبی زیاد و ژن‌های مقاومت متفاوت می‌تواند از شیوع و شدت بیماریگر تا حد زیادی جلوگیری کند، لذا تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژاد و تولید و تکثیر ارقامی با مقاومت نسبی بیشتر در برابر بیماری لکه غربالی مد نظر قرار گیرد. از طرفی با توجه به پراکندگی وسیع گونه‌های مختلف هسته دار در اقلیم‌های متفاوت، کشور ایران از همه گیر شدن این بیماری مصون نمی‌باشد. بعلاوه، این بیماری خسارت نسبتاً زیادی به انواع درختان هسته دار استان خراسان رضوی وارد می‌سازد (۶). بنابراین تحقیقات بیشتر در این زمینه برای جلوگیری شیوع این بیماری امری ضروری است. تحقیق حاضر، مقدمه‌ای است برای حل مسائل مربوط به این بیماری و امید است که بتواند زمینه را برای تحقیقات بعدی فراهم کند.

این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *W. carpophilus* در استان خراسان رضوی با استفاده از نشانگر مولکولی rep-PCR انجام شد. در این تحقیق، در مجموع ۲۰ جدایه از این قارچ با نشانگر مولکولی rep-PCR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی بین جدایه‌های این قارچ در استان خراسان رضوی با این نشانگر دیده می‌شود. این اولین تحقیق بر روی تنوع ژنتیکی جمعیت این قارچ با استفاده از تکنیک rep-PCR است. بر اساس نتایج این تحقیق، نشانگر rep-PCR به خوبی قادر به تفکیک جدایه‌های این قارچ بود و توانست جدایه‌هایی که به هم شباهت دارند و میزبان‌هایی که دارای همسانه‌های ژنتیکی هستند را از سایر جدایه‌ها متمایز کند. بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *Monosporascus cannonballus* با استفاده از این نشانگر (۴) نشان داد که این نشانگر به میزان زیادی قابل اعتماد، تکرارپذیر و سریع است و قدرت تمایز بالایی دارد. نتایج این تحقیق جدایه‌های این قارچ را در سطح تشابه ۶۹ درصد به ۱۲ گروه تقسیم کرد و جدایه‌های شهرستان‌های کلات و چناران را از نظر جغرافیایی و همچنین تا حدودی جدایه‌های آلو و زردآلو را از نظر میزبانی از سایر جدایه‌ها متمایز کرد. بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* با استفاده از این نشانگر (۹) نشان داد جدایه‌های این قارچ در سطح تشابه ۶۴ درصد به هفت گروه تقسیم شد که بیشتر

منابع

- 1- Adaskaveg J.E., Ogawa J.M., and Buttler E.E. 1990. Morphology and ontogeny of conidia in *Wilsonomyces carpophilus* gen. nov. and *comb. nov.*, causal pathogen of shot hole disease of *Prunus* species. *Mycologia*, 31:275-290.
- 2- Ahmadvpour A., Ghosta Y., Javan-Nikkhah M., Fatahi Moghadam M.R., and Ghazanfari K. 2011. A study on specificity and host range of *Wilsonomyces Carpophilus*, the causal agent of shot hole disease of stone fruit trees and evaluation of relative resistance of some peach cultivars. *Iranian Journal of Plant Protection Science (Iranian Journal of Agricultural Sciences)*, 42(2): 251-259. (in Persian with English Abstract)
- 3- Campbell J., and Skoglund L. 2011. Epidemic of Shot Hole Disease. *Urban IPM Newsletter*, 1(3): 1-6.
- 4- Cheragali V., Sarpeleh A., and Razavi M. 2012. Genetic diversity within *Monosporascus cannonballus* isolates in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 48: 1-12. (in Persian with English abstract)
- 5- Evans K., Frank E., Gunnell J., Pace M., and Shao M. 2008. *Coryneum* or Shot hole Blight. Utah State University Extension and Plant Pest Diagnostic Laboratory. 1-3.
- 6- Jafar poor B., Hatami B., and Hadad Irani nejad K. 1983. Illustrated collection of important fruit trees pests and diseases in the in Khorasan province. Publications of Jihad-e Daneshgahi of the Ferdowsi University of Mashhad. (in Persian)
- 7- Jalali F., Safaie N. and Abbasi S. 2010 Study of the genetic diversity of Iranian isolates of *Macrophomina phaseolina* causal agent of soybean charcoal rot, using ISSR and REP-PCR markers. *Journal of Genetic Novin*, 5(3):57-68. (in Persian)
- 8- Jedryczka M., Rouxel T., and Balesdent M.H. 1999. Rep-PCR based genomic fingerprinting of isolates of *Leptosphaeria maculans* from Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 813-823.
- 9- Karimi E., Safaei N., Shamsbakhsh M. 2009. Genetic diversity and pathogenic variability of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates using rep-PCR marker. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 45(3): 199-212. (in Persian with English abstract)
- 10- Kim W.K., Mauthe W., Hausner G., and Klassen G.R. 1990. Isolation of high molecular weight DNA and doublestranded RNAs from fungi. *Canadian Journal of Botany*, 68: 1898-1902.

- 11- Klimesova M., and Prasil K. 1989. Morphological variability of the conidia of *Alternaria alternata* (Hyphomycetes). *Novitates Botanicae Universitatis Carolinae*, 5: 7-27.
- 12- Komijani S., Razavi M. and Aminian H. 2010. Study on the genetic diversity of *Mycosphaerella graminicola* cause of septoria leaf blotch of wheat in Iran using SSR, SCAR and rep-PCR markers. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 45: 287-300. (in Persian)
- 13- Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens, C.T., and De Bruijn F.J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2286-2295.
- 14- Mehta Y.R. 1998. Severe outbreak of *Stemphylium* leaf blight, a new disease of cotton in Brazil. *Plant Diseases*, 82: 333-336.
- 15- Mehta A., Mehta Y.R., and Rosato Y.B. 2002. ERIC- and REP-PCR amplify non-repetitive fragments from the genome of *Drechslera avenae* and *Stemphylium solani*. *FEMS Microbiology Letters*, 211: 51-55.
- 16- Motallebi P., Javan-Nikkhah M., Okhovvat S. M. and Fotouhifar Kh. B. 2009. A study on population structure of *Pyricularia grisea* isolated from rice, based on rep-PCR molecular marker and Identification of vegetative compatibility groups. *Iranian Journal of Plant Protection Science (Iranian Journal of Agricultural Sciences)*, 42(2):227-239. (in Persian)
- 17- Murray H.G., and Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acid Research*, 8: 4321-4325.
- 18- Rafaila C., and Zaharia A. 1979. Biological and ecological features of *Stigmia carpophila* (Lev.) M. B. Ellis needed for the determination of forecasting and monitoring elements. *Analel Institutului Cercetari Pentru Protection Plantelor*, 14: 51-60.
- 19- Redondo C., Cubero J., and Melgarejo P. 2009. Characterization of *Penicillium* species by ribosomal DNA sequencing and BOX, ERIC and REP-PCR analysis. *Mycopathologia*, 168: 11-22.
- 20- Rogers S.O., Rehner S., Bledsoe C., Muller G.J., and Ammirati J.F. 1989. Extraction of DNA from Basidiomycetes for ribosomal DNA hybridization. *Canadian Journal of Botany*, 67: 1235-1243.
- 21- Toda T., Hyakumachi M., and Arora D. 1999. Genetic relatedness among and within different *Rhizoctonia solani* anastomosis groups as assessed by RAPD, ERIC and rep-PCR. *Microbiological Research*, 154: 247-258.
- 22- Van Belkum A., Scherer S., Van Alphen L., and Verbrugh H. 1998. Short sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 62: 275-293.
- 23- Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F.J., and Lupski L.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods of Molecular and Cell Biology*, 5: 25-40.
- 24- Yousefi A., Panjehkeh N., HagianShahri M., Salari M., and FalahatiRastegar M. 2010. Evaluation of Shot Hole Disease Incidence and Severity on Stone Fruit Trees in Razavi Khorasan Province. *Journal of Plant Protection*, 24 :218-221. (in Persian)