

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه های *Sclerotinia sclerotiorum* با استفاده
از نشانگر rep-PCR*

GENETIC DIVERSITY OF *Sclerotinia sclerotiorum* ISOLATES USING
REP-PCR MARKER

الهام کریمی، ناصر صفایی** و مسعود شمس بخش^۱

(تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۵)

چکیده

بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه کلزا ناشی از *Sclerotinia sclerotiorum* یکی از مهم ترین بیماری های قارچی کلزا در ایران می باشد. با توجه به اهمیت این بیماری و عدم وجود اطلاعات کامل از ساختار ژنتیکی جمعیت های این قارچ گروه های سازگاری میسلومی و تنوع ژنتیکی بین و درون گروه های سازگاری میسلومی (mycelial compatibility grouping, MCG) شناسایی شده از سه استان گلستان، مازندران و آذربایجان غربی بررسی شد. تعداد ۶۴ جدایه با توجه به پراکنش جغرافیایی انتخاب و MCG آنها تعیین گردید. در بین این تعداد جدایه، ۴۲ گروه سازگاری میسلومی شناسایی شد. آزمون های بررسی قدرت بیماری زایی (ویرولانسی) جدایه ها در گلخانه انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده های حاصل از ترکیب سه شاخص یادداشت برداری فنوتیپ زخم، طول زخم و درصد توسعه زخم دور ساقه جدایه ها را به سه گروه با قدرت بیماری زایی مختلف تقسیم نمود. نتایج این مطالعات نشان داد که قدرت بیماری زایی جدایه های درون یک MCG و نیز بین MCG ها متفاوت بود. در بررسی تنوع ژنتیکی بین MCG ها (۳۸ جدایه نماینده سی و هشت MCG)، بر اساس تجزیه و تحلیل الگوهای باندهای حاصل از مجموع چهار آغازگر rep-PCR در سطح تشابه ۶۴ درصد جدایه ها در هفت گروه قرار گرفتند. بر این مبنای بیشتر جدایه ها از لحاظ منشأ جغرافیایی از یکدیگر تفکیک شدند. قدرت تمایز بالای این نشانگر (D = ۰/۹۹۳) در تمایز ۳۸ جدایه به ۳۷ فنوتیپ نشان داد که می توان از rep-PCR به عنوان یک روش مفید و سریع برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه های *S. sclerotiorum* استفاده کرد.

واژه های کلیدی: کلزا، *Sclerotinia sclerotiorum*، گروه های سازگاری میسلومی، تنوع ژنتیکی

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

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

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیاران بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

مقدمه

میسلیومی توانایی دو جدایه برای هم‌جوشی و تشکیل یک کلونی یک‌دست (Kohn *et al.* 1990) و نشان دهنده وجود هتروژنی درون گونه‌ای می‌باشد. MCGها نماینده افرادی هستند که از نظر ژنتیکی متفاوت اند و هر MCG به‌لحاظ ژنتیکی با بقیه MCG های تعیین شده تفاوت دارد. به‌طوری که از MCGها به‌عنوان یک نشانگر مرفولوژیکی سریع و مؤثر برای شناسایی تنوع درون گونه‌ای بین جمعیت‌های *S. sclerotiorum* استفاده شده‌اند (Kohn *et al.* 1991). در مطالعات زیادی نشانگرهای مولکولی ریز ماهاوره (Atallah *et al.* 2004., Mert- Türk *et al.* 2007., Sexton & Howlett 2004., Carpenter *et al.* 1999.,) RFLP و (Sexton *et al.* 2006 Cubeta *et al.* 1997., Ekins *et al.* 2005., Hambleton *et al.* 2002., Kohn *et al.* 1991., Kohli *et al.* 1992., Kohn *et al.* 1988.) برای بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های *S. sclerotiorum* استفاده شده‌اند.

نشانگر مولکولی rep-PCR به‌عنوان یک نشانگر مؤثر برای شناسایی گونه‌های باکتریایی و بررسی تنوع ژنتیکی آنها استفاده شده است (Versalovic *et al.* 1994). اگر چه آغازگرهای rep-PCR برای عناصر تکراری در ژنوم‌های پروکاریوت‌ها طراحی شده‌اند ولی این آغازگرها برای تکثیر نواحی بین توالی‌های تکراری در ژنوم یوکاریوت‌ها (Kaur *et al.* 2005) و نیز برای بررسی تنوع ژنتیکی در سطوح بین یا درون گونه‌ای چندین جنس قارچ استفاده شده است (McDonald *et al.* 2000; Arruda *et al.* 2003).

از آن جایی که *S. sclerotiorum* یک قارچ همه جازی بوده و اسکروت‌های مقاوم آن قادرند در خاک به‌مدت چند سال زنده بمانند، با در دست داشتن اطلاعات صحیح از ساختار ژنتیکی جمعیت‌های *S. sclerotiorum* می‌توان ارقام مناسبی برای مناطق جغرافیایی مختلف یا

بیماری پوسیدگی اسکروتینایی ساقه کلزا (Sclerotinia Stem Rot, SSR) مهم‌ترین بیماری این محصول در ایران می‌باشد که از استان‌های گلستان، مازندران، گیلان و اردبیل گزارش شده است (Afshari Azad & Chegini 2005). عامل این بیماری *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary می‌باشد و دارای طیف میزبانی گسترده‌ای است، به‌طوری که می‌تواند بیش از ۴۰۸ گونه گیاهی متعلق به ۲۷۸ جنس از ۷۵ خانواده را مورد حمله قرار دهد (Boland & Hall 1994). زمستان‌گذرانی عامل بیماری در مناطق معتدله به‌صورت تشکیل اسکروت در بافت‌های آلوده می‌باشد. اسکروت‌ها پس از جوانه‌زنی آپوتسیوم و آسکوسپور تولید می‌کنند. آسکوسپورها به وسیله باد در هوا منتشر شده، گل‌برگ‌های کلزا را آلوده می‌کنند و گل‌برگ‌های پوسیده پس از ریزش، روی ساقه‌های کلزا قرار گرفته، پوسیدگی ساقه را ایجاد می‌کنند (Kohli *et al.* 1992).

تنوع درون گونه‌ای در بیماری‌زایی (Marciano *et al.* 1982, 1983; Purdy 1979; Morrall *et al.* 1972) و در ویژگی‌های مرفولوژیکی مانند رنگ میسلیوم، آسک و آسکوسپور، اندازه اسکروت و تولید آن (Purdy 1955, 1979; LeTourneau 1979; Boland & Smith 1991) در *S. sclerotiorum* گزارش شده است. با این وجود، گروه‌بندی‌های درون گونه‌ای بر مبنای این ویژگی‌ها امکان پذیر نیست زیرا اساس ژنتیکی این ویژگی‌ها هنوز به‌خوبی شناسایی نشده و احتمالاً بسیار پیچیده است (Lumsden 1979). به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های این قارچ از روش‌های انگشت نگاری دی.ان.ا. و گروه‌بندی افراد بر اساس سازگاری میسلیومی استفاده شده است (Kohn *et al.* 1988, 1990, 1991). سازگاری

آگار انجام گرفت.

بررسی قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها

بذرهای کلزا رقم اکاپی (Okapi) در گلدان‌های (به قطر ۱۴ سانتی‌متر) حاوی خاک سترون، پیت و پرلیت به نسبت مساوی کشت گردید و در دمای 21 ± 2 درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از سبز شدن در هر گلدان چهار گیاهچه نگهداری شد. گیاهان در مرحله شش برگگی مطابق روش ژاو و همکاران (Zhao et al. 2004) مایه‌زنی شدند و گلدان‌ها را زیر اطاقک‌های نایلونی قرار داده و با اسپری آب زیر نایلون‌ها به مدت سه روز رطوبت مورد نیاز تأمین شد. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی و با دو بار تکرار انجام شد. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه بار تکرار به اجرا درآمد و این آزمون دو بار تکرار گردید. به منظور ارزیابی قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها چهار نوع یادداشت برداری شامل اندازه‌گیری طول زخم، فنوتیپ زخم، درصد توسعه زخم دور ساقه و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری صورت گرفت. پنج نوع فنوتیپ زخم چهارده روز پس از مایه زنی ثبت گردید (Zhao et al. 2004) که عبارت بودند از:

۰= بدون علائم

۱= وجود زخم آب سوخته روی دمبرگ

۲= وجود زخم کوچک در محل اتصال دمبرگ به ساقه

۳= وجود زخم آب سوخته کوچک روی ساقه، بدون ایجاد پژمردگی

۴= وجود زخم آب سوخته گسترده روی ساقه، بدون ایجاد پژمردگی

۵= وجود زخم آب سوخته فرو رفته روی ساقه، ایجاد پژمردگی غیر قابل برگشت اندام‌های هوایی

جمعیت‌های متنوع این قارچ ایجاد نمود که این خود منجر به پایداری مقاومت در آن مناطق خواهد شد (McDonald 1997). علی‌رغم اهمیتی که بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا دارد تاکنون در ایران پژوهش منسجمی در جهت بررسی تنوع ژنتیکی این قارچ صورت نگرفته است. در این پژوهش MCG جدایه‌های *S. sclerotiorum* جمع‌آوری شده، قدرت بیماری‌زایی آنها و همچنین تنوع ژنتیکی این بیمارگر با استفاده از نشانگر مولکولی rep-PCR تعیین می‌شود.

روش بررسی

جداسازی بیمارگر

در طی فصول زراعی سال‌های ۸۵-۱۳۸۴ و ۸۶-۱۳۸۵ ضمن بازدید از مزارع کلزای استان‌های گلستان، مازندران و آذربایجان غربی نمونه‌های گیاهی (ساقه) مشکوک به بیماری اسکروتینیایی ساقه که دارای آثاری از قارچ شامل میسلیم سفید رنگ روی ساقه‌های آلوده و اسکروت داخل ساقه‌های ترک خورده، و یا علائمی از بیماری بودند جمع‌آوری و پس از ثبت مزرعه، منطقه و تاریخ نمونه برداری هر یک از نمونه‌ها، به‌طور جداگانه داخل پاکت‌های کاغذی قرار داده شدند.

به‌منظور جداسازی قارچ عامل بیماری، اسکروت‌های موجود در ساقه‌های آلوده کلزا جدا و به مدت سه دقیقه در اتانول ۷۰ درصد ضد عفونی سطحی شده و پس از خشک کردن با کاغذ صافی سترون، اسکروت روی محیط عصاره سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) گذاشته شد. تشتک‌های پتری کشت شده به مدت پنج روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. خالص سازی جدایه‌ها به روش نوک هیف روی محیط کشت آب

تعیین MCG

به منظور تعیین MCG تعداد ۶۴ جدایه بر اساس پراکنش جغرافیایی از شش منطقه انتخاب شدند. آزمون‌های بررسی سازگاری میسلیمی به روش اسکافر و کوهن (Schafer and Kohn, 2006) انجام شدند. جدایه‌ها روی محیط سیب‌زمینی-دکستروز-آگار کشت داده شده و به مدت سه تا چهار روز در دمای ۲۰ تا ۲۲ درجه سلسیوس و تاریکی نگهداری شدند. برای بررسی سازگاری میسلیمی، دو دیسک به قطر دو میلی‌متر از حاشیه فعال پرگنه دو جدایه برداشته و به فاصله ۳/۵ سانتی‌متر از یکدیگر روی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار که به آن ۱۷۵ میکرولیتر در لیتر رنگ قرمز ساخت شرکت McCormick اضافه شده قرار داده شدند، یک جفت در هر تشتک پتری، و در دمای ۲۲ درجه سلسیوس و تاریکی نگهداری شدند. نمونه‌ها ۴، ۷ و ۱۱ روز بعد از مقابل هم قرار دادن مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی جفت‌ها، هنگامی که یک خط قرمز در حد فاصل دو جدایه تشکیل شد یا یک نوار نازک یا ضخیم از میسلیم‌های هوایی در این ناحیه مشاهده گردید، واکنش به‌عنوان یک واکنش ناسازگار ثبت شد. در مقابل، هنگامی که پرگنه در حال رشد دو جدایه جفت شده روی محیط کشت در هم ادغام شده و تشکیل یک کلونی یکدست دادند به‌عنوان واکنش سازگار در نظر گرفته شد. چون چنین جفت‌هایی کاملاً سازگار هستند، به‌عنوان شاهد برای بررسی جفت‌هایی که دو جدایه متفاوت در مقابل هم قرار داده شده بودند، در نظر گرفته شدند.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از محلول نمکی DNA استفاده شد (Safaie et al. 2005). پس از انجام عملیات استخراج،

کیفیت DNA استحصالی به وسیله الکتروفورز و غلظت آن با استفاده از اسپکتوفتومتر سنجش شد.

تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *S. sclerotiorum* با استفاده از نشانگر rep-PCR

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های این بیمارگر تعداد ۳۸ جدایه (به‌عنوان نماینده هر MCG) انتخاب گردید که مشخصات آنها در جدول ۱ آورده شده است. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) چهار آغازگر *ERIC1R*، *ERIC2*، *REP2-I* و *BOX A1R* مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲). تکثیر قطعات دی.ان.ا. در ترموسایکلر اپندورف گرادیانست (Ependorfe gradient, Germany) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل بافر PCR (IX)، ۰/۲ میلی‌مولار از هر یک از دزوکسی نوکلئوتیدها، ۲ میلی‌مولار از کلرید منیزیم، ۱ میکرومولار از آغازگر و ۱/۵ واحد از آنزیم Taq پلیمرز (CinaGen, Tehran) انجام گرفت. چرخه دمایی برای واکنش پی.سی.آر. به صورت واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵^{°C} به مدت دو دقیقه و تکرار ۳۵ چرخه شامل یک دقیقه واسرشته سازی در دمای ۹۴^{°C}، ۱:۳۰ دقیقه در دمای اتصال مناسب هر آغازگر و دو دقیقه برای گسترش در دمای ۷۲^{°C} و گسترش نهایی به مدت هشت دقیقه در ۷۰^{°C} بود. (McDonald et al. 2000). برای مشاهده محصول PCR (۱۰ میکرولیتر) الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر ۱X TBE (۸۹ میلی‌مولار تریس، ۸۹ میلی‌مولار بوریک اسید، ۲ میلی‌مولار EDTA) با ولتاژ ثابت ۸۵ ولت به مدت سه ساعت انجام گرفت. با استفاده از دستگاه فتوگرافی ساخت شرکت Vilbert Lourmat در فرانسه مدل 5×20-2A T-Ø محل قطع

Archive of SID

Archive of SID

Archive of SID

Archive of SID

سازی گردید. از این تعداد جدایه، ۶۴ جدایه بر اساس پراکنش جغرافیایی انتخاب و قدرت بیماری‌زایی آنها در گلخانه مورد آزمون قرار گرفت. طول زخم ایجاد شده روی ساقه (شکل ۱) و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری هفت، ده و چهارده روز پس از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. هم‌چنین، فنوتیپ زخم‌ها و درصد توسعه زخم دور ساقه در روز آخر یادداشت برداری ثبت شدند.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که جدایه‌ها از نظر قدرت بیماری‌زایی با یکدیگر تفاوت دارند. در این مطالعه داده‌های حاصل از چهار شاخص یادداشت برداری به صورت ترکیبی نیز آنالیز شدند که ترکیب داده‌های حاصل از شاخص درصد آلودگی زخم دور ساقه، فنوتیپ زخم و طول زخم ایجاد شده روی ساقه ترکیب مناسبی تشخیص داده شدند. مقایسه میانگین داده‌های حاصل از این ترکیب با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن جدایه‌ها را به ۱۱ گروه تقسیم کرد (جدول ۱). بر این اساس، جدایه Q1 (از ارومیه) بیشترین و جدایه H9.4 (از هاشم آباد) کمترین قدرت بیماری‌زایی را دارا بودند. فنوگرام حاصل از ترکیب سه شاخص یادداشت برداری درصد توسعه زخم دور ساقه، فنوتیپ زخم و طول زخم ایجاد شده روی ساقه ترسیم شده به روش (Ward 1963) و ضریب اقلیدوسی جدایه‌ها را به سه گروه تقسیم کرد که گروه اول شامل جدایه‌های با قدرت بیماری‌زایی بالا، گروه دوم شامل جدایه‌هایی با قدرت بیماری‌زایی متوسط و گروه سوم در برگیرنده جدایه‌هایی با کمترین قدرت بیماری‌زایی بود (دندروگرام نشان داده نشده است). در هیچ کدام از موارد ارتباط معنی‌داری بین قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها، نواحی جغرافیایی آنها و MCG‌های تعیین شده مشاهده نشد.

DNA تفکیک شده روی ژل زیر نور UV عکس‌برداری شد.

آنالیز داده‌ها

برای امتیازدهی باندها و تعیین ارتباط ژنتیکی بین جدایه‌ها، نخست اندازه هر یک از باندهای دی.ان.ا که به خوبی روی ژل قابل رؤیت بودند برای تمام جدایه‌ها مشخص گشت. اندازه باندها با استفاده از نرم افزار Photo-capt ساخت شرکت Vilber Lourmat در فرانسه و بر اساس اندازه باندهای نردبان ژنومی یک کیلو بازی تعیین شد. ژل بر اساس حضور (۱) یا عدم حضور باند (۰) امتیازدهی شد و سپس بر اساس باندهای مشترک روی ژل ماتریس داده‌ها تشکیل شد. بر اساس نتیجه ماتریس شباهت که با استفاده از ضریب تشابه جاکارد به دست آمده بود، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای به کمک روش UPGMA در نرم افزار NTSYS-pc (Rohlf 2000) انجام و دندروگرام مربوطه ترسیم شد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای بررسی ارتباط بین جدایه‌ها نیز صورت گرفت.

به منظور ارزیابی توانایی نشانگر مولکولی استفاده شده در تمایز بین جدایه‌ها شاخص تنوع سیمپسون از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$D = 1 - \left(\frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^N X_i(X_i - 1) \right)$$

در این رابطه N تعداد کل جدایه‌ها در جمعیت و X_i تعداد جدایه‌های قرار گرفته در گروه i ام می‌باشد (Simpson 1949).

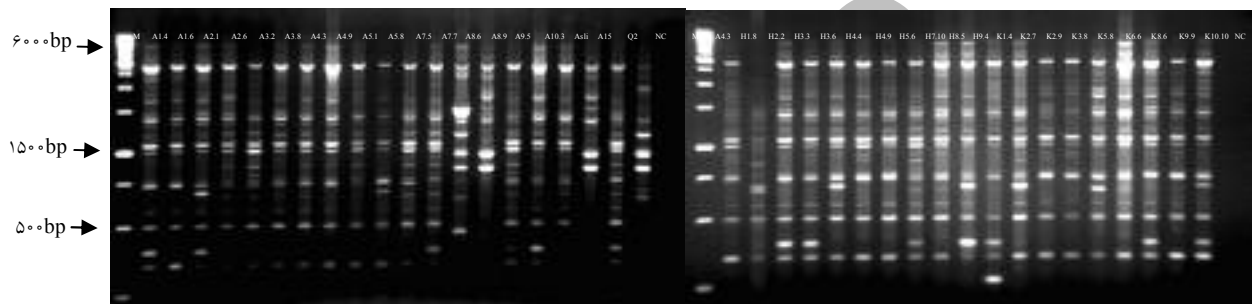
نتیجه

جداسازی و بررسی قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها

از مجموع ۳۵۰ ساقه کلزای دارای علائم بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی تعداد ۲۰۵ جدایه *S. sclerotiorum* خالص



شکل ۱. علائم بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزا هفت روز پس از مایه زنی
Fig. 1. Symptoms of *Sclerotinia* stem rot of canola 7 days after inoculation



شکل ۲. الگوی دی.ان.ا. تکثیر شده در ۳۸ جدایه منتخب *Sclerotinia sclerotiorum* با استفاده از آغازگر ERIC IR. M: نردبان ژنومی یک کیلو بازی، NC: کنترل منفی

Fig. 2. DNA fingerprinting of 38 selected isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* using ERIC IR primer. M: DNA ladder 1kb (Fermentase), NC: Negative Control

از ۲۷۰ الی ۴۸۰۰ جفت باز متغیر بود. آغازگر BOX AIR تعداد سه تا دوازده باند تولید کرد که از ۳۰۰ تا ۴۸۰۰ جفت باز متغیر بود. این آغازگر بیشترین قدرت تمایز دهنده کارایی بهتر این آغازگر در قدرت تفکیک جدایه‌ها از یکدیگر است. آغازگر REP2-I تعداد نه تا چهارده باند تکثیر کرد که اندازه قطعات به دست آمده از این آغازگر از ۲۶۰ الی ۶۰۰۰ جفت باز متغیر بود (شکل ۲). آغازگر ERIC1R و BOX 1AR بیشترین تعداد لوکوس و آغازگر REP2-I کمترین تعداد لوکوس را تکثیر نمودند. بر اساس تجزیه و تحلیل خوشه‌ای نتایج حاصل از هر آغازگر مشخص گردید که هیچ تفاوتی در گروه‌بندی اصلی جدایه‌ها توسط چهار آغازگر وجود ندارد.

تعیین MCG

تعداد ۶۴ جدایه از شش منطقه جغرافیایی جهت بررسی سازگاری میسلیمی انتخاب شدند. در بین این تعداد سی و هشت MCG شناسایی شد (داده‌های منتشر نشده).

تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های *S. sclerotiorum*

هر چهار آغازگر REP2-I, ERIC2I, ERIC1R و BOX 1AR وادد تکرارپذیری و چند شکلی بودند، بهترین دمای اتصال به دست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول ۲ آورده شده است. آغازگر ERIC 1R تعداد دوازده تا ۲۷ باند تولید کرد که اندازه قطعات به دست آمده از ۳۰۰ الی ۴۳۰۰ جفت باز متغیر بود. آغازگر ERIC 2I تعداد شش تا هفده باند تولید کرد که اندازه قطعات به دست آمده

جدول ۲. توالی، دمای اتصال، تعداد لوکوس تکثیر شده، درصد لوکوس های چند شکل، تعداد کل زیر گروه‌ها، تعداد زیر گروه‌های متشکل از یک جدایه و قدرت تمایز آغازگرهای استفاده شده برای ۳۸ جدایه *Sclerotinia sclerotiorum* مورد مطالعه

Table 2. Sequence, annealing temperature, number of amplified loci, polymorphic loci percent, number of types, number of types represented by a single isolate and discriminatory power of the primers used for the 38 *Sclerotinia sclerotiorum* isolates tested

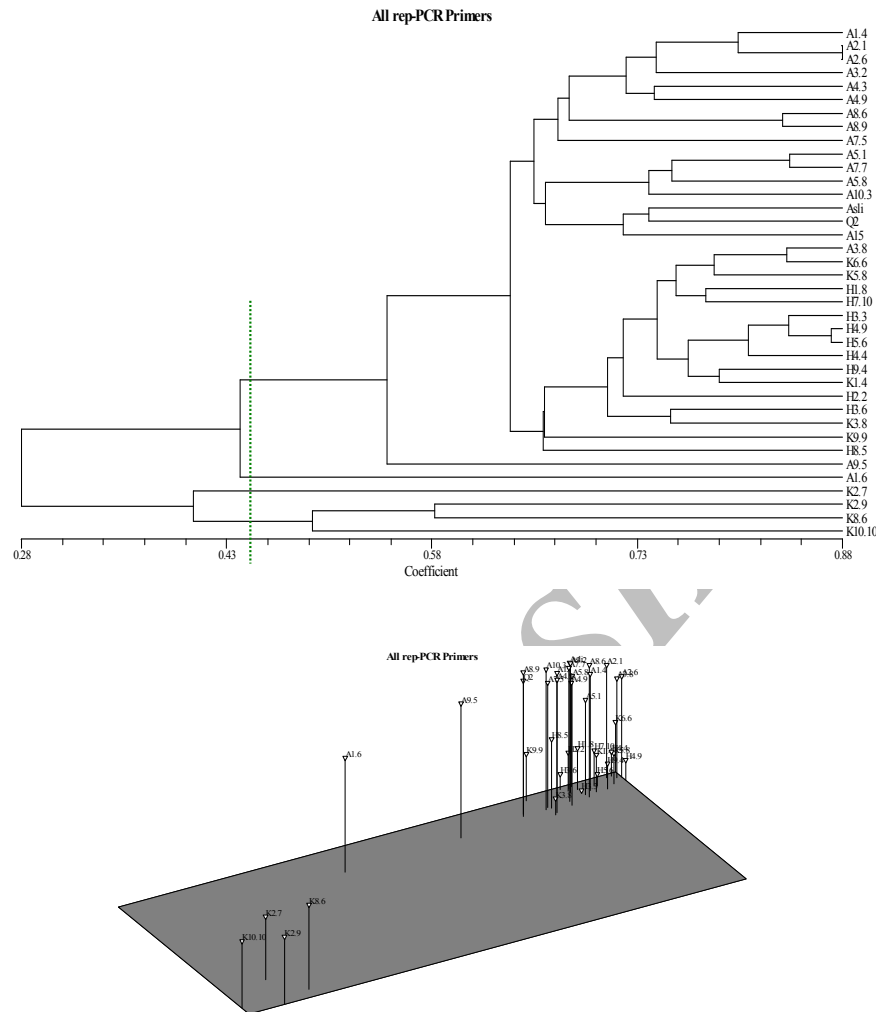
آغازگر Primer	توالی Sequence	دمای اتصال (%) Annealing temperature	تعداد لوکوس‌های تکثیر شده No. amplified loci	درصد لوکوس‌های چند شکل Polymorphic loci percent	N	n	D
ERIC1 R	5'- ATGTAAGC TCCTGGGG ATTCAC-3'	45	34	100	36	34	0.997
ERIC2I	5'- ATGTAAGT GACTGGGG TGAGCG-3'	51	31	100	32	27	0.990
REP2-I	5'- ICGITTATCI GGCCTAC-3'	41	22	90.91	30	24	0.986
BOX 1AR	5'- CTACGGCA AGGCGACG CTGACG-3'	66	34	100	37	36	0.998
Mean	-	-	30	97.73	-	--	0.993

N: تعداد کل زیر گروه‌ها؛ n: تعداد زیر گروه‌های متشکل از یک جدایه؛ D: قدرت تمایز قدرت تمایز

N: number of types; n: number of types represented by a single isolate; D: discriminatory power

آباد به همراه ۵۵/۵۶ درصد جدایه‌های متعلق به کلاله در گروه دوم جای گرفتند. تجزیه به مختصات اصلی بر اساس ماتریس تشابه به دست آمده از ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS (Ver. 2.02) انجام گرفت. همان‌طور که انتظار می‌رفت مؤلفه اول بیشترین تغییرات را (در حدود ۶۰/۹۲ درصد) نسبت به سایر مؤلفه‌ها توجیه می‌کند و مؤلفه دوم حدود پنج درصد تغییرات را توجیه می‌کند. با ادامه این روال مؤلفه دوازدهم تنها یک درصد و مؤلفه‌های بعد از آن کمتر از یک درصد تغییرات را توجیه می‌کنند (اطلاعات نشان داده نشده است). بنابراین، دوازدهم مؤلفه

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل الگوهای بانندی حاصل از مجموع چهار آغازگر rep-PCR در سطح تشابه ۴۴ درصد جدایه‌ها را به چهار گروه تقسیم نمود، پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نیز تایید کننده این مطلب می‌باشد (شکل ۳). ۸۶/۸۵ و ۷/۹ درصد جدایه‌ها به ترتیب به گروه اول و چهارم تعلق داشتند و گروه دوم و سوم هر کدام دارای یک جدایه بودند. نتایج حاصل از تلفیق داده‌های rep-PCR توانست اکثر جدایه‌ها را در سطح تشابه ۶۴ درصد از لحاظ منشا جغرافیایی تفکیک کند. در این سطح تشابه ۸۱/۲۵ درصد جدایه‌های منطقه علی آباد در یک گروه قرار گرفتند و همه جدایه‌های منطقه هاشم



شکل ۳. دندروگرام مربوط به تنوع ژنتیکی ۳۸ جدایه منتخب *Sclerotinia sclerotiorum* حاصل از تلفیق الگوهای بانندی چهار آغازگر rep-PCR بر اساس روش UPGMA و ضریب جاکارد و پلات سه بعدی حاصل از آن

Fig. 3. Dendrogram depicting genetic diversity of 38 selected isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* resulting from combination of banding pattern of four rep-PCR primers, using UPGMA method and Jaccard's coefficient and three-dimensional plot

ژنتیکی جدایه‌های *S. sclerotiorum* جدا شده از کلزا با استفاده از نشانگر rep-PCR بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی گروه‌های سازگاری میسلیمی نشان داد که جدایه‌های *S. sclerotiorum* هر مزرعه کلزا از یک یا دو MCG تشکیل شده است. در یک جمعیت مزرعه‌ای *S. sclerotiorum*، تنوع گروه‌های سازگاری میسلیمی می‌تواند توسط فاکتورهایی چون انتخاب گذرا و انتخاب

اول ۸۵ درصد تغییرات را توجیه می‌کنند. این در حالی است که در بیشتر موارد در مورد صفات کمی به خصوص هنگامی که صفات هم‌بستگی زیادی داشته باشند دو تا سه مؤلفه اول بیش از ۹۰ درصد تغییرات را توجیه می‌کنند.

بحث

در این مطالعه برای اولین بار در ایران MCG و تنوع

صورت نگرفته است و از این رو برای شناسایی MCG‌های مشترک لازم است که جدایه‌های بیشتری از این مناطق جمع‌آوری شود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که جدایه‌های متعلق به MCG‌های مختلف و در بیشتر موارد جدایه‌های متعلق به یک MCG در سطح یک درصد از نظر بیماری‌زایی تفاوت معنی داری با یکدیگر دارند. این تنوع در بیماری‌زایی جدایه‌ها و MCG‌ها به نظر نمی‌رسد که با منشا جغرافیایی آنها ارتباطی داشته باشد. تفاوت در بیماری‌زایی MCG‌های متعلق به یک مزرعه نشان دهنده این است که گروه‌های سازگاری میسلیمی احتمالاً فنوتیپ‌های مناسب را حفظ می‌کنند. نتایج مطالعات مورال و همکاران (Morrall et al. 1972) نشان داد که حتی جدایه‌هایی از *S. sclerotiorum* که از کشت‌های تک آسکوسپوره‌های متعلق به یک اسکروت به دست آمده‌اند کاملاً از نظر ویژگی‌هایی چون مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیماری‌زایی با یکدیگر متفاوت هستند. این نتایج نشان می‌دهد که نوترکیبی میوزی در آنها رخ داده است. هم‌چنین، جدایه‌های *S. sclerotiorum* به دست آمده از پروتوپلاست نیز از لحاظ مورفولوژیکی و بیماری‌زایی با یکدیگر تفاوت دارند (Boland & Smith 1991).

نشانگر مولکولی rep-PCR که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت توانست ۳۸ جدایه *S. sclerotiorum* که هر کدام نماینده یک MCG بودند را به ۳۷ ژنوتیپ تفکیک کند و لذا نتایج مطالعات کوهن (Kohn 1991) را تایید کرد و نشان داد که گروه‌های سازگاری میسلیمی نماینده افرادی هستند که از نظر ژنتیکی متفاوت اند و هر MCG به لحاظ ژنتیکی با بقیه MCG‌های تعیین شده تفاوت دارد. از نشانگر rep-PCR برای تکثیر نواحی توالی‌های تکراری در ژنوم یوکاریوت‌ها (Kaur et al.

تنوع‌گرا به همراه مکانیسم‌هایی مانند مهاجرت، دگرگونی و جهش حفظ شود. وجود پدیده انتخاب تنوع‌گرا در جمعیت‌ها باعث انتخاب ژنوتیپ‌های مختلف در شرایط محیطی متفاوت می‌شود. در جمعیت‌هایی که در معرض شرایط محیطی متغیر هستند، وجود هم‌زمان چندین MCG نسبت به یک جمعیت کلونال یا همگون مطلوب‌تر است. جمعیت‌های *S. sclerotiorum* در مزرعه تحت تأثیر شرایط محیطی متغیر هستند چرا که تاریخچه کشت، واریته‌های میزبان، شرایط اقلیمی ماکرو و میکرو و عملیات کشاورزی همه باعث ایجاد یک محیط متغیر می‌شوند (Kohli et al. 1992) و لذا به نظر می‌رسد که جمعیت‌های این بیمارگر در مزرعه به صورت ناهمگون هستند که نتایج این مطالعه موید این مطلب است.

مطالعات صورت گرفته در کانادا نشان داده‌اند که یکسری از کلون‌ها تا فاصله بیش از ۲۰۰۰ کیلومتر پراکنده شده‌اند (Kohli et al. 1995)، در صورتی که نتایج تحقیق حاضر نشان داد که هیچ MCG ای بین مناطق مورد مطالعه مشترک نبود. این نتیجه احتمالاً نشان‌دهنده این است که پروپاگول‌های این بیمارگر بین این مناطق جابجا نشاندند یا جابجایی کمی صورت گرفته است و یا این که MCG‌ها و ژنوتیپ‌های خاصی تحت شرایط محیطی و رقابت انتخاب شده‌اند (Kull et al. 2004). دلیل دیگر تفاوت نتیجه مطالعه حاضر با نتیجه مطالعه کوهلی و همکاران (1995) ممکن است ناشی از مقیاس و مدت زمان کشت کلزا در کانادا و ایران باشد، چرا که در کانادا کلزا در مقیاس وسیع به مدت بیش از ۲۰ سال کشت می‌شود و لذا یک منبع دائمی برای اینوکوم این بیمارگر فراهم می‌شود که پراکنش قارچ را تسهیل می‌کند (Carpenter et al. 1999). هم‌چنین، عدم وجود MCG مشترک بین این مناطق ممکن است به این دلیل باشد که نمونه برداری ما در سطح وسیع

تکراری، که در سلسله باکتریها حفاظت شده است، در قارچ *S. sclerotiorum* از آسکومیستها نیز وجود دارند. توزیع این توالیها در بین جدایه‌های مورد بررسی متفاوت بود، چرا که ۳۸ جدایه را به ۳۷ ژنوتیپ متمایز کرد و لذا نشانگر مولکولی rep-PCR می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر مفید برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *S. sclerotiorum* به‌کار رود.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر تنوع ژنتیکی بالایی بین جمعیت‌های *S. sclerotiorum* در مناطق مورد بررسی وجود دارد و این موضوع با استفاده از یک نشانگر مورفولوژیکی (MCG) و نشانگر مولکولی rep-PCR در این پژوهش به اثبات رسیده است. بنابراین باید توجه کرد که هر سیستم مدیریت بیماری اتخاذ شده در این مناطق می‌بایست قادر باشد با بیماری‌گری مقابله کند که چنین تنوع ژنتیکی بالایی را دارا می‌باشد. روش‌های مبارزه‌ای که در مقابل چندین ژنوتیپ مؤثر هستند ممکن است در برابر ژنوتیپ‌های دیگر مؤثر واقع نشوند. بنابراین باید تلفیقی از سیستم‌های مدیریت بیماری، ترکیبی از کنترل زراعی، شیمیایی، بیولوژیکی و ارقام متحمل یا مقاوم، استفاده شوند و هم‌چنین کارایی چنین سیستم‌هایی باید روی دامنه وسیعی از جدایه‌های *S. sclerotiorum* بررسی شود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (60-57) متن انگلیسی مراجعه شود.

(2005) و نیز برای بررسی تنوع در سطوح بین یا درون گونه‌ای چندین جنس قارچ استفاده شده است (McDonald et al. 2000; Arruda et al. 2003). این نشانگر یک روش تقریباً جدید برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچی می‌باشد که می‌تواند روش‌های انگشت‌نگاری مبتنی بر دی.ان.ا را تکمیل کند (George et al. 1998). نشانگر rep-PCR توالی‌های بین نسخه‌هایی از یک توالی دی.ان.ا تکراری در ژنوم را که به‌صورت تصادفی پراکنده شده‌اند را تکثیر می‌کند. در بررسی تجزیه به مختصات اصلی، نشان داده شد که دوازده مولفه اول ۸۵ درصد تغییرات را توجیه می‌کنند که بیانگر این است که نشانگر مورد استفاده توزیع یکنواخت و مناسب در سطح ژنوم داشته است. در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی بهترین حالت این است که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسب در سطح کل ژنوم داشته باشند تا بتوانند کل ژنوم را نمونه برداری کنند. بنابراین، در صورتی که نشانگرها از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشند همبستگی بین آنها کم خواهد بود و در نتیجه به مولفه‌های بیشتری جهت توجیه تغییرات کل نیاز است.

نتایج مطالعات مولکولی نشان داد که تنوع بسیار بالایی بین جدایه‌های *S. sclerotiorum* در مناطق مورد بررسی وجود دارد. وجود تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت‌ها نشان دهنده نرخ بالای مهاجرت و یا تبادل ژنتیکی و نوترکیبی می‌باشد (Kohli et al. 1995). از طرفی دیگر، نتایج این پژوهش نشان داد که توالی‌هایی مشابه این توالی‌های