مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره دوم (پیاپی ۱۵) تابستان ۱۳۹۲
صفحات ۱۳۱-۱۱۷

Original Article

بررسی تنوع ژنتیک جدایه های قارچ *آلترناریا* عامل بیماری لکه برگی مرکبات به روش IGS-RFLP

علیرضا نیازمند *[۱]، مریم رحمانی [۲]، گیلدا نجفی پور [۱]

[۱] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه بیماری شناسی گیاهی، [۲] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه بیماری شناسی گیاهی

چکیده

سابقه و هدف: امروزه به منظور بررسی تفاوت های درون گونه ای و نژادی از روش RFLP ناحیه IGS استفاده می شود. این مطالعه با هدف شناسایی گونه های بیماری زای *آلترناریا* عامل تولید لکه برگی مرکبات با استفاده از روش های مورفولوژیک و توالی یابی ناحیه ITS1 در شهرستان ممسنی و نیز بررسی تفاوت های ژنتیکی جدایه های این قارچ بر اساس RFLP ناحیه IGS انجام گردید.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۷۰ نمونه برگی گونه ها و ارقام مختلف مرکبات دارای علایم ظاهری مانند لکه قهوه ای و لکه برگی جمع آوری شده از باغات مرکبات شهرستان ممسنی در پاییز سال ۱۳۹۰ انجام شد. نمونه ها بر روی محیط سیب زمینی آگار کشت گردیدند. پس از خالص سازی قارچ به روش تک اسپور، شناسایی گونه ها با استفاده از بررسی خصوصیات مورفولوژیک انجام گرفت. اثبات بیماری زایی جدایه ها با استفاده از اصول کخ روی برگ ها صورت گرفت. تکثیر نواحی ITS1 و IGS با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام پذیرفت. ناحیه ITS1 جدایه ها توالی یابی شدند و ناحیه IGS پس از برش با استفاده از آنزیم های برش دهنده با روش RFLP ارزیابی شد.

یافته ها: تمامی جدایه های مورد بررسی از لحاظ مورفولوژیک و توالی یابی ناحیه ITS1 به عنوان گونه *آلترناریا آلترناتا* شناسایی شدند. دندروگرام ترسیمی برای الگوهای برشی آنزیم های مورد استفاده، جدایه ها را در ۳ گروه متمایز قرار داد. جدایه هایی که از ارقام پرتقال جمع آوری شده بودند همگی در یک گروه و جدایه های لیمو در یک گروه متمایز دیگر قرار گرفتند. همچنین جدایه لیموشیرین ویکوا در یک گروه کاملاً مجزا از سایر جدایه ها قرار گرفت.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که به کارگیری الگوهای برش آنزیمی ناحیه IGS می تواند مشکل مربوط به طبقه بندی جدایه های *آلترناریا آلترناتا* مرکبات بر حسب نوع میزبان را که در حال حاضر مورد بحث بسیار زیادی می باشد تاحدودی حل نماید.

واژگان کلیدی: پرتقال، لیمو، لیمو شیرین، ITS1، *آلترناریا آلترناتا*.

دریافت مقاله: بهمن ماه ۹۱ پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ۹۲

مقدمه

مرکبات یکی از محصولات عمده بخش باغبانی ایران است که از نظر تغذیه و سلامت مردم اهمیت ویژه ای دارد. بر اساس آخرین آمار منتشره فائو در سال ۲۰۱۱، از میان کشورهای تولید کننده مرکبات، ایران مقام پانزدهم را دارا است و مقدار تولید سالیانه آن ۳۶۴۸۸ هزار تن می باشد (۱). استان فارس از لحاظ تولید مرکبات در ایران دارای مقام دوم است (۲). شهرستان ممسنی دارای حدود ۲۰۶۵۰ هکتار باغات دیم و آبی بوده کـــه

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه بیماری شناسی گیاهی.
تلفن: ۰۹۱۷۷۱۰۴۸۷۰ پست الکترونیک: niazmand2003@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

همه ساله حدود ۱۷۵۳۲۵ تن محصولات باغی مختلف را به بازارهای فروش عرضه می نماید. سطح زیر کشت مرکبات این شهرستان ۴۵۰ هکتار و میزان تولید سالیانه ۶۷۵ تن می باشد. بیماری لکه برگی مرکبات که توسط گونه های مختلف جنس *آلترناریا* (*Alternaria*) به وجود می آید، یکی از بیماری های مهم مرکبات است که در بسیاری از نقاط جهان شیوع دارد. این قارچ سبب تولید بیماری های مختلفی در مرکبات شامل بیماری لکه قهوه ای آلترناریایی نارنگی، لکه برگی آلترناریایی راف لمون، پوسیدگی سیاه آلترناریایی بعد از برداشت میوه و بیماری مانچای شاخساره ای لیمو می شود (۳). عامل سه بیماری اول *آلترناریا آلترناتا* (*Alternaria alternata*) و عامل بیماری مانچای شاخساره ای لیمو *آلترناریا لیمی کولا* (*Alternaria limicola*) می باشد (۳). اولین گزارش از وقوع لکه قهوه ای ناشی از قارچ *آلترناریا آلترناتا* بر روی نارنگی پیج ایران توسط گل محمدی (Gol Mohammadi) و رحیمیان (Rahimiian) در سال ۱۳۸۳ ارائه شده است (۴).

هر چند جدایه های *آلترناریا آلترناتا* با گونه های مختلف مرکبات از لحاظ مورفولوژیکی مشابه با یکدیگر هستند اما از لحاظ ژنتیکی و بیماری زایی متفاوت بوده و چند جدی (پلی فایلتیک) می باشند. این موضوع کاربرد عملی گونه های مورفولوژیک و گونه هایی که از لحاظ ویژگی های فیلوژنتیک از هم متمایز شده اند را زیر سؤال می برد. وجود چندین گونه مورفولوژیک در چندین گروه فیلوژنتیک و داشتن چندین جد برای حداقل یک گونه مورفولوژیک، به وضوح نشان می دهد که گونه های مورفولوژیک نمی توانند بیانگر ارتباطات تکاملی در میان این قارچ ها باشند (۵).

ناحیه IGS (Intergenic Spacer) بین نواحی 28S و 18S از rRNA قرار دارد. نواحی IGS و ITS (Internal Transcribed Spacer) به عنوان منبعی برای اطلاعات مربوط به شناسایی بسیاری از گونه‌های قارچی مورد استفاده قرار گرفته اند (۶). ناحیه IGS، نسبت به ناحیه ITS درجه بالاتری از تنوع درون و بین گونه‌ای را دارد و کاملاً اختصاصی می باشد. ناحیه IGS فاصله اندازی است که دارای سرعت تکاملی بسیار بالایی می باشد. گونه های بسیار نزدیک به یکدیگر می توانند تفاوت های زیادی در ناحیه IGS را نشان دهند. این تفاوت ها می تواند به صورت تفاوت های طولی و یا تفاوت هایی در توالی های این ناحیه باشد (۷).

به منظور بررسی تفاوت های درون گونه ای و همچنین تفاوت های نژادی درون یک گونه از توالی یابی ناحیه IGS استفاده می شود (۱۰-۸). اخیراً به کارگیری تکنیک IGS-RFLP در رابطه با جنس های *آرمیلاریا* (*Armillaria*)، *ساکارومیسس* (*Saccharomyces*)، *لاکاریا* (*Laccaria*) و *هبلوما* (*Hebeloma*) مورد استفاده قرار گرفته است (۱۴-۱۱). نواحی IGS و ITS سریع تر از سایر نواحی rRNA تکامل می یابند، از این روا استفاده از این نواحیبه منظور بررسی تفاوت های ژنتیکی در سطوح گونه، درون یک جنس و حتی نژاد های یک جنس مفید می باشد. توالی های مربوط به ناحیه ITS، با ثبات هستند و درون یک گونه تفاوت های اندکی را نشان می دهند و معمولاً از توالی های این ناحیه برای بررسی تفاوت های ژنتیکی گونه های یک جنس و طراحی آغازگرهای مخصوص گونه استفاده می گردد (۱۷-۱۵).

بر اساس اطلاعات موجود، تا کنون در ایران و جهان تحقیقی در رابطه با بررسی تفاوت های ژنتیکی جدایه های مرکبات این قارچ در ناحیه IGS انجام نگرفته است. بنابراین مطالعه حاضر برای اولین بار با هدف شناسایی گونه های بیماری زای *آلترناریا* عامل تولید لکه برگی مرکبات در شهرستان ممسنی با استفاده از روش های مورفولوژیک و توالی یابی ناحیه ITS1 و بررسی تفاوت های ژنتیکی جدایه های این قارچ بر اساس RFLP ناحیه IGS انجام گردید.

مواد و روش‌ها

الف) جمع آوری نمونه ها و کشت قارچ: در پاییز سال ۱۳۹۰ به صورت مقطعی- توصیفی از باغات مرکبات شهرستان ممسنی تعداد ۷۰ نمونه برگی از گونه ها و ارقام مختلف مرکبات شامل پرتقال ارقام نافی، قاشقی و والنسیا، لیمو ترش، لیمو شیرین ویکوا و لیمو شیرین معمولی که دارای علایم

Archive of SID
www.SID.ir

ظاهری مانند لکه قهوه ای و لکه برگی جمع آوری گردید. در ابتدا سطح برگ های جمع آوری شده با آب شهر شستشو داده شدند و سپس قسمت های آلوده برگ ها همراه با قسمتی از بافت سالم قطعه قطعه و ضد عفونی سطحی شدند. سپس قطعات برگی شستشو و به خوبی خشک گردیدند و در زیر هود لامینارفلو به محیط کشت سیب زمینی آگار (Potato Dextrose Agar= PDA) منتقل شدند. تشتک های PDA حاوی نمونه ها به مدت ۷ روز در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید.

ب) خالص سازی قارچ: به منظور دست یابی به خلوص ژنتیکی، خالص سازی جدایه ها با استفاده از روش تک اسپور انجام شد.

ج) شناسایی گونه ها و آزمون بیماری زایی جدایه ها: جدایه های خالص شده از نظر ویژگی های مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند و با استفاده ازویژگی های توصیف شده در کتاب شناسایی گونه های قارچ *آلترناریا*، گونه قارچ شناسایی شد (۱۸). به منظور اثبات بیماری زایی جدایه ها از اصول کخ (Koch's rules) استفاده گردید. برگ های جوان مرکبات فاقد هر گونه علایم بیماری و جمع آوری شده از باغات منطقه در تشتک های حاوی آب آگار قرار گرفتند و توسط یک قطعه از محیط کشت PDA به ابعاد ۲ در ۲ میلی متر، حاوی قارچ *آلترناریا* مایه‌زنی شدند. عملیات مایه‌زنی هر رقم، روی برگ های همان رقم انجام گرفت. برای نمونه شاهد یک قطعه از محیط کشت PDA بدون قارچ با همان ابعاد استفاده گردید. تیمارها به دو گروه طبقه بندی شدند: تیمارهایی که روی برگ های بدون خراش و تیمارهایی که روی برگ هایی که توسط نوک یک تیغ استریل در حدود ۱ میلی متر خراش دهی شده بودند، قرار گرفتند. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد و طرح آزمایشی مورد استفاده طرح کاملاً تصادفی بود. تیمارها درون گرمخانه ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و بیماری زایی و عدم بیماری زایی جدایه ها پس از گذشت ۲-۱ هفته مورد بررسی قرار گرفت.

د) استخراج DNA: به منظور استخراج کل DNA از ۷ جدایه خالص شده قارچ از میزبانان پرتقال نافی، پرتقال قاشقی، پرتقال والنسیا جدایه ۱و۲، لیمو ترش، لیمو شیرین معمولی، لیمو شیرین ویکوا استفاده گردید. از ریسه های جوان (۲ روزه) قارچ در محیط کشت PDA، استخراج DNA با روش CTAB انجام شد (۱۹). کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگاروز ۱٪ با استفاده از الکتروفورز و رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت.

ه) انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز و تکثیر ناحیه های ITS1 و IGS: به منظور انجام PCR برای تکثیر ناحیه ITS1 از آغازگرهای ITS1 و (۲۰) ITS2 و برای تکثیر ناحیه IGS از آغازگرهای 26S3111F و IGS27 استفاده گردید (۲۰) (جدول ۱). مواد، مقادیر حجمی و چرخه های دمایی در واکنش PCR برای تکثیر ناحیه ITS1 از روش پیشنهاد شده وایت (White) و همکاران در سال۱۹۹۰ (۲۱) و برای تکثیر ناحیه IGS از روش توصیه شده هونگ (Hong) و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۲۲) استفاده شد. محصولات تکثیر شده نواحی ITS و IGS توسط PCR روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط ژل داک مورد بررسی قرار گرفتند.

و) توالی یابی محصولات PCR ناحیه ITS1: محصولات به دست آمده از PCR ناحیه ITS1 جهت انجام توالی یابی مستقیماً به شرکت سیناژن ارسال گردید و توسط شرکت کره ای ماکروژن (Macrogen) توالی یابی جدایه ها انجام شد. توالی ها توسط نرم افزار Bankit در بانک ژن به ثبت رسیدند و شماره دسترسی به آن ها دریافت شد (KF734427 الی KF734432).

ز) روش RFLP: به منظور انجام RFLP از آنزیم های برشی *Hinf*I، *Bsn*I، *Rsa*I، *Bssm*I و *Alu*I استفاده گردید. نیم میکرولیتر از آنزیم مورد نظر، پنج میکرولیتر از محصولات PCR هر جدایه با مقادیر توصیه شده توسط شرکت سازنده از بافر واکنشی (Reaction Buffer) و آب مقطر استریل درون میکروتیوب مخلوط گردیدند. تیوب ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه نگهداری شدند. سپس محصولات برشی حاصل از هر آنزیم روی ژل آگاروز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفتند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر نواحی ITS1 و IGS

نام آغازگر	توالی	اندازه (bp)
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	۳۶۰
ITS2	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	۳۶۰
26S3111F	5- AGGGAACGTGAGCTGGGTTTAG-3'	۳۰۰۰-۳۳۰۰
IGS27	5'-AATGAGCGATTCGCAGTTTC-3'	۳۰۰۰-۳۳۰۰

ح) تجزیه و تحلیل داده ها: به منظور مقایسه توالی های تکثیر شده ناحیه ITS1 در جدایه های مورد بررسی با توالی های موجود در بانک ژن از نرم افزار اینترنتی NCBI Blast Search استفاده گردید. پس از آماده سازی توالی ها، هم ترازی آن ها با کمک نرم افزار $MEGA_4$ انجام گرفت. به منظور بررسی چگونگی ارتباط توالی های ناحیه ITS1 جدایه های *آلترناریا* مرکبات با یکدیگر، درخت شجره یابی با استفاده از نرم افزار $MEGA_4$ و به روش پیوست همسایه ها (Neighbor joining) ترسیم گردید. با استفاده از نسخه 2.02 e نرم افزار NTSYS-PC و با به کارگیری روش کلاستر (UPGMA)، دندروگرام مربوط به تشابه جدایه های *آلترناریای* مرکبات، بر اساس الگو های برشی آنزیمی ناحیه IGS ترسیم گردید. گروه بندی جدایه ها بر اساس ترسیم خط برشی به صورت چشمی تعیین گردید. از نرم افزار SAS به منظور تجزیه و تحلیل آماری میزان رشد جدایه ها استفاده گردید. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمالی ۵ درصد انجام پذیرفت.

یافته ها

الف) شناسایی گونه بر اساس خصوصیات مورفولوژیک و ژنتیکی: ویژگی های مورفولوژیک جدایه ها با خصوصیات توصیف شده در کتاب شناسایی گونه های قارچ *آلترناریا* برای گونه *آلترناریا آلترناتا* مطابقت داشت (۱۸). زنجیره کنیدیوم ها کوتاه و دارای انشعابات زیادی بودند. اما در گونه *آلترناریا تنوییسیما* (*A. tenuissima*) زنجیره کنیدیوم ها طویل و بدون انشعاب بودند. مقایسه توالی های ناحیه ITS1 جدایه ها با توالی های موجود در سایت NCBI، نشان داد که توالی جدایه های مورد بررسی دارای بیشترین میزان تشابه (۹۹ الی ۱۰۰ درصد) با گونه های *آلترناریا آلترناتا* و *آلترناریا تنویی سیما* می باشند (جدول ۲). با توجه به ویژگی های مورفولوژیکی و مقایسه توالی ها جدایه ها به عنوان گونه های *آلترناریا آلترناتا* شناسایی شدند.

ب) آزمون بیماری زایی جدایه ها: تمامی جدایه های مورد بررسی هم روی برگ های بدون خراش و هم روی برگ های خراش دهی شده تولید علایم بیماری نمودند. در رابطه با برگ های بدون خراش پس از گذشت ۲۴ روز سطح برگ نکروزه گردید اما در رابطه با برگ خراش دهی شده پس از گذشت ۱۱ روز کل سطح برگ نکروزه گردید. بنابراین تمامی جدایه های مورد بررسی دارای توان بیماری زایی بودند و هیچکدام ساپروفیت نبودند.

ج) میزان رشد قارچ در محیط آزمایشگاه: نتایج نشان داد که میانگین میزان رشد قارچ در طی روزهای مختلف یادداشت برداری (روزهای دوم، چهارم و ششم) متفاوت و از نظر آماری معنی دار بود (۲/۰۵۳*a*، ۴/۶۷ *b* و ۵/۵ *c*).

نتایج آماری همچنین نشان داد که از لحاظ میانگین رشد جدایه ها روی محیط کشت PDA در طی ۶ روز یادداشت برداری جدایه لیمو شیرین ویکوا دارای بیشترین مقدار رشد و جدایه های پرتقال نافی و پرتقال قاشقی کمترین مقدار رشد را داشتند (جدول ۳).

د) تکثیر نواحی ITS1 و IGS: تکثیر ناحیه ITS1 جدایه های مورد بررسی توسط PCR محصولاتی با اندازه ۳۶۰ جفت بازی تولید نمود که چند شکلی طولی در رابطه با آن ها مشاهده نشد

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲: میزان درصد تشابه توالی ناحیه ITS1 جدایه های مورد بررسی با توالی های موجود در سایت NCBI

نام جدایه	درصد تشابه	
	A. tenuissima	*A. alternate*
پرتقال نافی	٪۱۰۰	٪۱۰۰
لیمو ترش	٪۹۹	٪۹۹
لیمو شیرین معمولی	٪۹۹	٪۹۹
لیمو شیرین ویکوا	٪۹۹	٪۹۹
پرتقال قاشقی	٪۹۹	٪۹۹
پرتقال والنسیا جدایه ۱	٪۱۰۰	٪۱۰۰
پرتقال والنسیا جدایه ۲	٪۱۰۰	٪۱۰۰

(شکل ۱). تکثیر ناحیه IGS جدایه های مورد بررسی توسط PCR محصولاتی با اندازه های ۳۰۰۰ و ۳۳۰۰ جفت بازی ایجاد نمود که چند شکلی طولی در رابطه با آن ها مشاهده شد (شکل ۲). اندازه باند جدایه پرتقال نافی ۳۰۰۰ جفت بازی و جدایه های لیموترش، لیمو شیرین معمولی، لیموشیرین ویکوا، پرتقال قاشقی و پرتقال والنسیا جدایه ۱ و ۲ دارای اندازه باند ۳۳۰۰ جفت بازی بودند.

ه) درخت تکاملی مربوط به توالی های ناحیه ITS1: بر اساس نتایج به دست آمده از ترسیم درخت تکاملی بدون ریشه جدایه ها بر اساس توالی های ناحیه ITS1 جدایه های مورد بررسی در دو گروه (clade) قرار گرفتند. گروه اول شامل جدایه پرتقال قاشقی بود که به طور کلی از سایر جدایه ها متمایز بود. گروه دوم شامل سایر جدایه های مورد بررسی بود (شکل ۳). به طور کلی این نتایج نشان داد که تفاوت های ژنتیکی در ناحیه ITS1 جدایه های مورد بررسی در سطوح درون گونه ای نیز بین جدایه های جمع آوری شده از میزبانان مختلف این قارچ در این ناحیه ژنومی وجود دارد.

و) RFLP ناحیه IGS جدایه های قارچی:

آنزیم AluI: الگوی باندهای برشی با به کارگیری آنزیم *AluI* در شکل ۴ الف، مشاهده می شود. دندروگرام ترسیم شده برای الگوهای به وجود آمده حاصل از برش آنزیم *AluI* در ناحیه IGS جدایه های *آلترناریا آلترناتا* مرکبات را با تشابه ۱۰۰٪ در ۳ گروه متمایز قرار داد (شکل ۵).

آنزیم BssmI: الگوی باندهای برشی با به کارگیری آنزیم *BssmI*، در شکل ۴ ب، نشان داده شده است. دندروگرام ترسیم شده برای الگوهای برشی حاصل از برش آنزیم *BssmI* در ناحیه IGS جدایه های *آلترناریا آلترناتا* مرکبات مورد بررسی جدایه ها را در ۴ گروه متمایز قرار داد (شکل ۶).

آنزیم RsaI: بیشترین تعداد الگوهایی برشی توسط به کارگیری این آنزیم حاصل شد (شکل ۴ ج). دندروگرام ترسیم شده برای الگوهای باندی بوجود آمده حاصل از برش آنزیم *RsaI* در ناحیه *IGS* جدایه های *آلترناریا آلترناتا* مرکبات را با تشابه ۱۰۰٪ در ۵ گروه متمایز قرار داد (شکل ۷).

آنزیم BsnI: الگوهای برشی آنزیم *Bsn1* در شکل ۴ د ،آورده شده است. دندروگرام ترسیم شده برای الگوهای برشی حاصل از برش آنزیم *BsnI* ناحیه IGS جدایه های *آلترناریا آلترناتا* مرکبات را با تشابه ۱۰۰٪ در ۳ گروه متمایز قرار داد (شکل ۸).

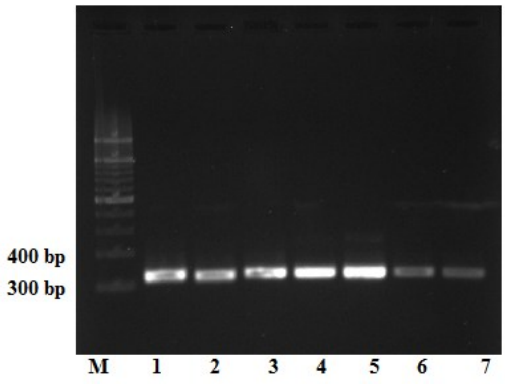
جدول ۳: مقایسه میانگین میزان رشد جدایه های مختلف قارچ *آلترناریا آلترناتا* پس از ۶ روز

نام جدایه	میانگین رشد قارچ (*cm*)	
پرتقال نافی	۳/۸۷۸	*E
پرتقال تو سرخ	۳/۹۰۰	*DE*
پرتقال قاشقی	۳/۸۶۷	*E*
پرتقال والنسیا	۳/۹۴۴	*CDE*
نارنگی خارو	۴/۱۴۴	*B*
نارنگی معمولی	۴	*CD*
نارنگی گلابی	۴/۰۳۳	*C*
لیمو شیرین معمولی	۳/۹۴۴	*CDE*
لیمو شیرین ویکوا	۴/۸۶۷	*A*
لیمو ترش	۴/۱۶۷	*B*

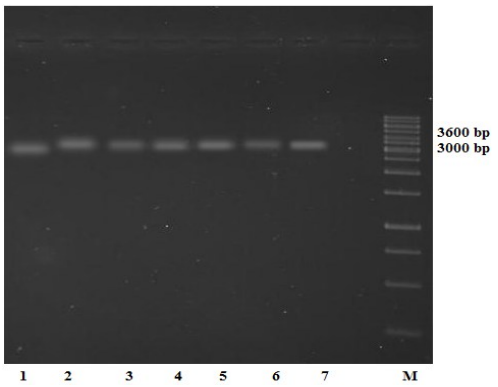
*A-E گروه بندی میانگین ها بر اساس آزمون دانکن، میانگین هایی دارای حروف مشترک اختلاف معنی داری با هم ندارند.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: محصولات PCR حاصل از تکثیر ناحیه ITS1 جدایه های مختلف قارچ *آلترناریا آلترناتا* مرکبات روی ژل آگاروز ۱ درصد، ردیف های ۱ تا ۷ به ترتیب جدایه های پرتقال نافی، لیمو ترش، لیمو شیرین معمولی، لیمو شیرین ویکوا، پرتقال قاشقی، پرتقال والنسیا ۱، پرتقال والنسیا ۲.



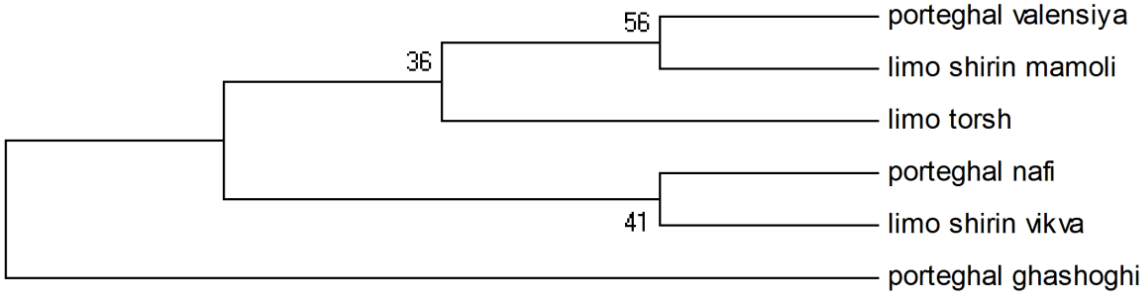
شکل ۲: محصولات PCR حاصل از تکثیر ناحیه IGS جدایه های مختلف قارچ *آلترناریا آلترناتا* مرکبات روی ژل آگاروز ۱ درصد، ردیف های ۱ تا ۷ به ترتیب جدایه های پرتقال نافی، لیمو ترش، لیمو شیرین معمولی، لیمو شیرین ویکوا، پرتقال قاشقی، پرتقال والنسیا ۱، پرتقال والنسیا ۲

آنزیم HinfI: الگوهای برشی آنزیم *HinfI* در شکل ۴ ه، آورده شده است. دندروگرام ترسیم شده برای الگوهای باندی ایجاد شده حاصل از برش آنزیم *HinfI* در ناحیه IGS جدایه های *آلترناریا آلترناتا* مرکبات را با تشابه ۱۰۰٪ در ۳ گروه متمایز قرار داد (شکل ۹).

ز) تأثیر ۵ آنزیم برشی بر ناحیه IGS جدایه های مختلف مرکبات: دندروگرام ترسیم شده برای الگوهای برشی حاصل از ۵ آنزیم مورد استفاده در ناحیه IGS در جدایه های مورد بررسی در خط برشی ۷۵ درصد جدایه ها را در ۳ گروه متمایز قرار داد (شکل ۱۰). گروه اول شامل جدایه های پرتقال نافی و قاشقی، جدایه های ۱ و ۲ پرتقال والنسیا و لیمو شیرین معمولی بود. گروه دوم شامل جدایه لیمو شیرین ویکوا و گروه سوم شامل جدایه لیمو ترش بود. بر اساس دندروگرام ترسیمی نتیجه گیری شد که جدایه هایی که از ارقام پرتقال جمع آوری شده بودند همگی در یک گروه قرار گرفتند و نسبت به جدایه های لیمو (ترش و شیرین ویکوا) متمایز بودند.

جدایه های لیموشیرین ویکوا و لیمو ترش در دو گروه کاملاً مجزا از یکدیگر و سایر جدایه ها قرار گرفتند. در میان جدایه های پرتقال نیز دو جدایه ای که از پرتقال والنسیا جمع آوری شده بودند در یک گروه قرار گرفتند. جدایه های پرتقال قاشقی و پرتقال نافی کاملاً با یکدیگر مشابه بودند.

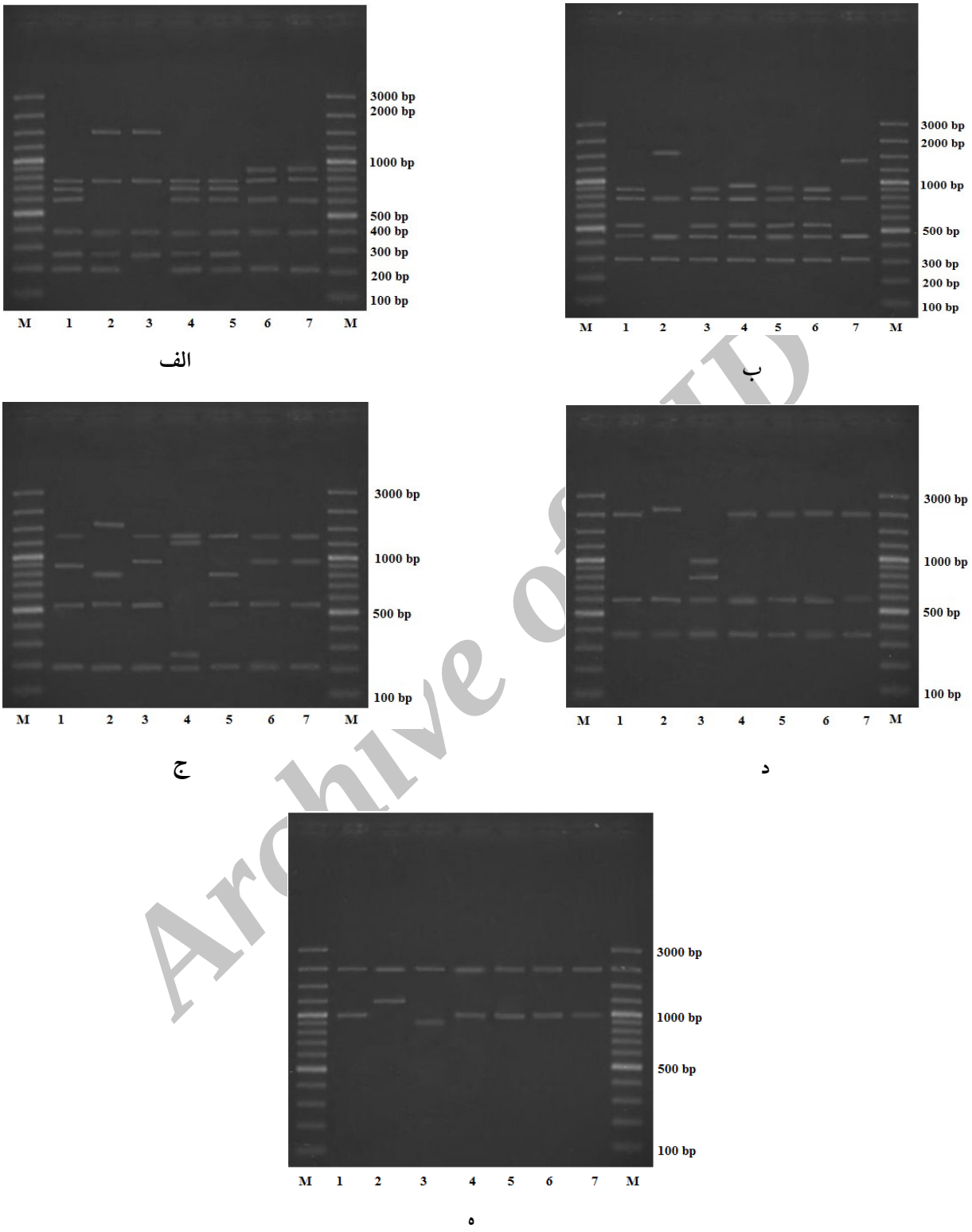
به عنوان یک نتیجه گیری کلی چنین می توان گفت که هر چند همه جدایه های مورد بررسی گونه *آلترناریا آلترناتا* بودند، اما از نظر الگوهای برشی آنزیمی ناحیه IGS بر حسب نوع میزبان از یکدیگر متمایز شدند. تفاوت های درون گونه ای (زیر گونه ای) در بین جدایه های قارچ *آلترناریا*



شکل ۳: درخت تکاملی توالی های ناحیه ITS1 جدایه های مختلف قارچ *آلترناریا آلترناتا* مرکبات

Archive of SID

www.SID.ir



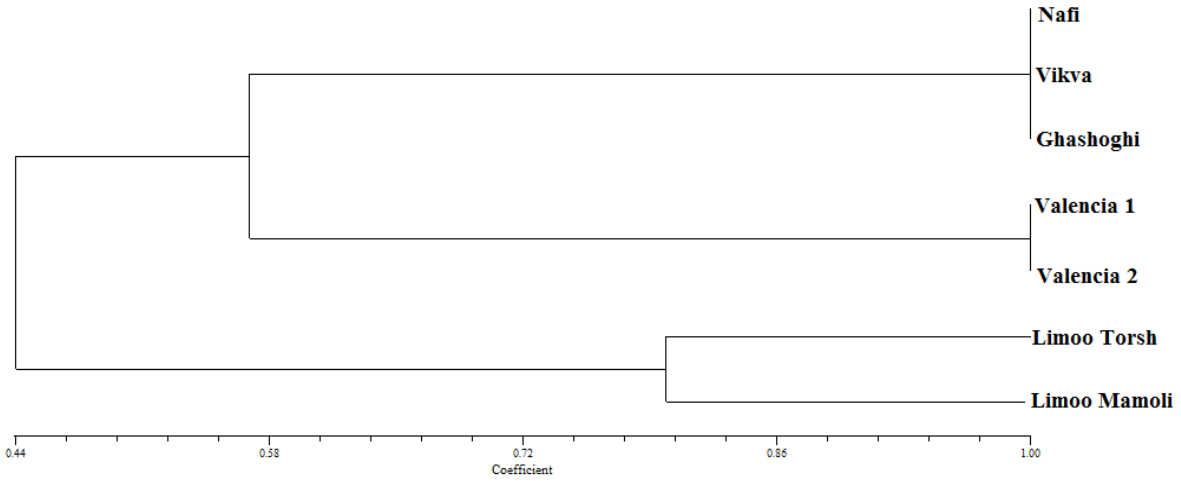
شکل ۴: الگوهای برشی حاصل از به کارگیری آنزیم های مختلف ناحیه IGS جدایه های مختلف مرکبات روی ژل آگاروز ۱ درصد. الف) *AluI*، ب) *BssmI*، ج) *RsaI*، د) *BsnI*، ه) *HinfI*. ردیف های ۱ تا ۷ به ترتیب جدایه های پرتقال نافی، لیمو ترش، لیمو شیرین معمولی، لیمو شیرین ویکوا، پرتقال قاشقی، پرتقال والنسیا ۱، پرتقال والنسیا ۲ را نشان می دهد.

Archive of SID

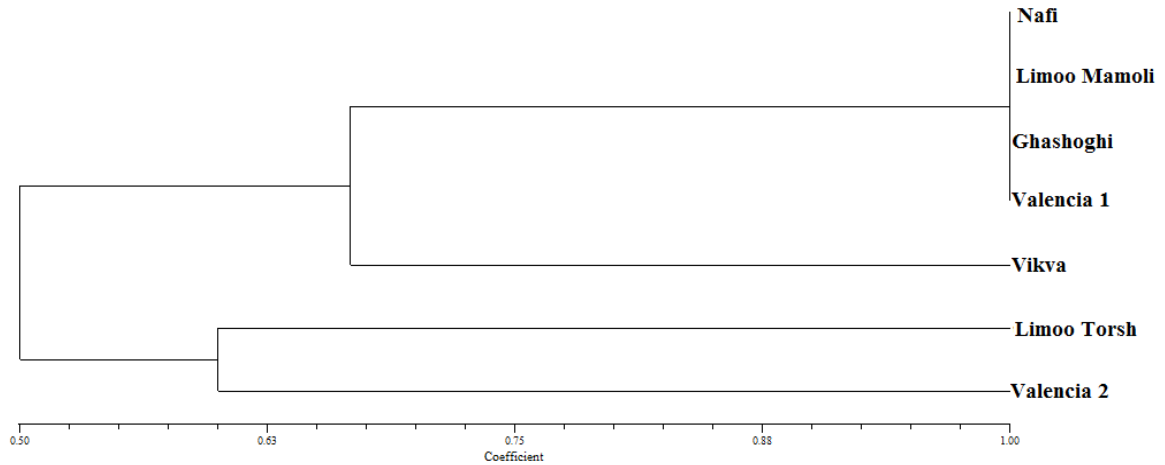
www.SID.ir

بحث

نتایج به دست آمده در این تحقیق در رابطه با شناسایی گونه قارچ عامل بیماری لکه برگی مرکبات ممسنی نشان داد که تمامی جدایه های مورد بررسی گونه *آلترناریا آلترناتا* می باشند. نتایج به دست آمده مشابه با نتایج سایر محققین ایرانی و خارج از کشور بود. در ایران قارچ *آلترناریا آلترناتا* از انواع گونه های مرکبات از جمله نارنج، لیموشیرین و سایر مرکبات جداسازی و گزارش شده است (۲۵-۲۳). در خارج از کشور نیز گونه های *آلترناریا آلترناتا* و *آلترناریا لیمی کولا* از مرکبات جداسازی و گزارش شده است (۲۸-۲۶). شایان یادآوری است که این تحقیق اولین گزارش از جداسازی این گونه قارچی از مرکبات منطقه ممسنی است. در تحقیق انجام گرفته جدایه های قارچ *آلترناریا آلترناتا* از ارقام مختلف پرتقال و لیمو جداسازی و اثبات بیماری زایی شدند. در تحقیقات انجام گرفته در سایر نقاط دنیا، این بیماری بیشتر روی میزبانانی چون نارنگی و لیمو مورد بررسی قرار گرفته بود (۳۰-۲۹)، اما در تحقیق حاضر

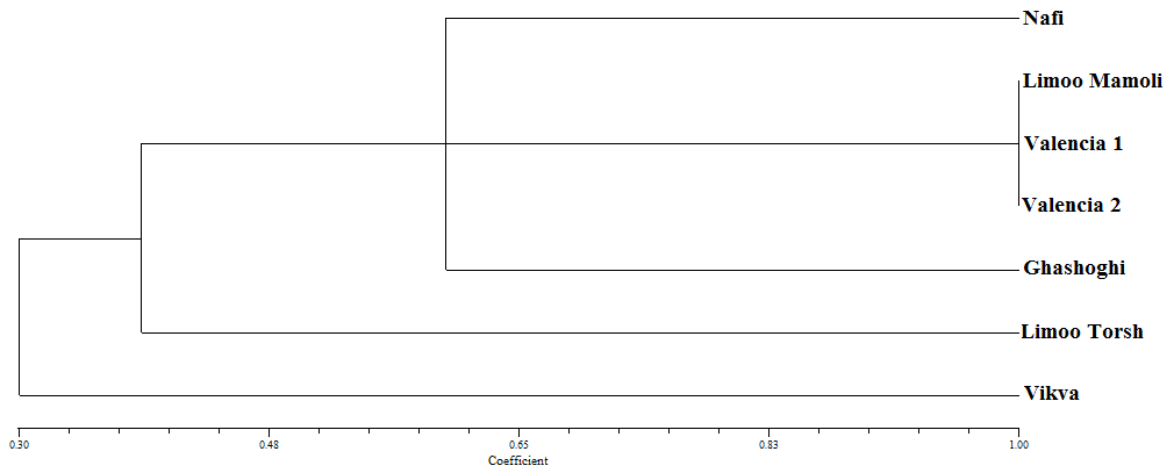


شکل ۵: دندروگرام حاصل از به کارگیری آنزیم *AluI*

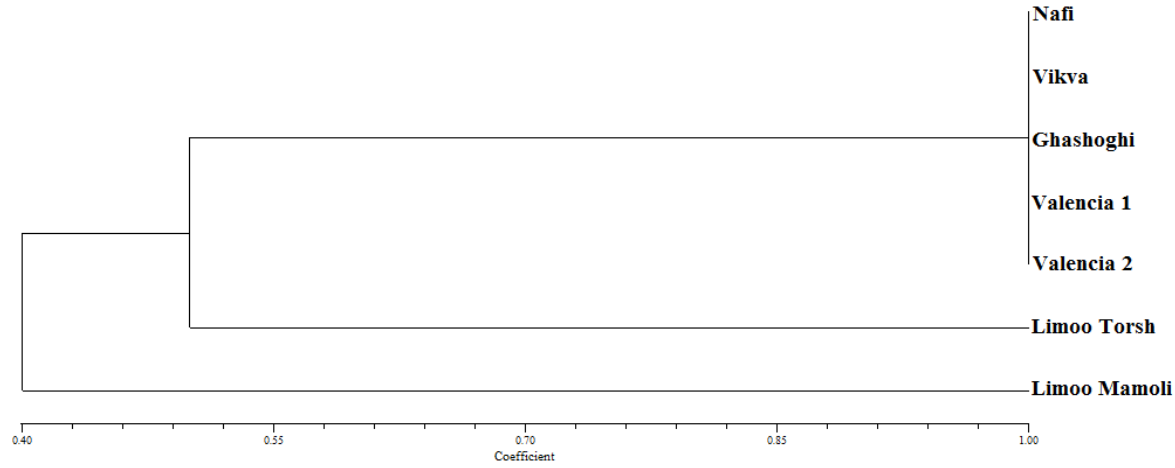


شکل ۶: دندروگرام حاصل از به کارگیری آنزیم *BssmI*

www.SID.ir



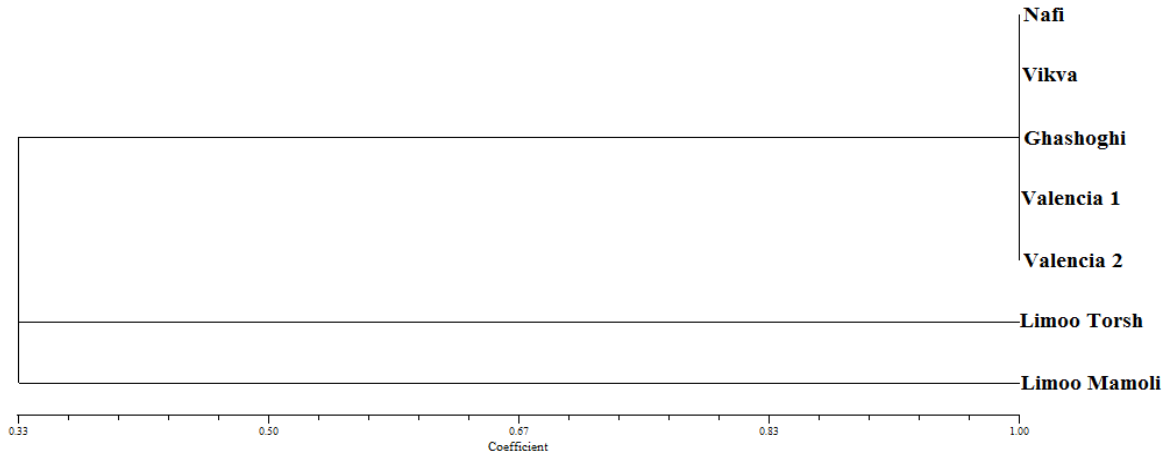
شکل ۷: دندروگرام حاصل از به کارگیری آنزیم *RsaI*



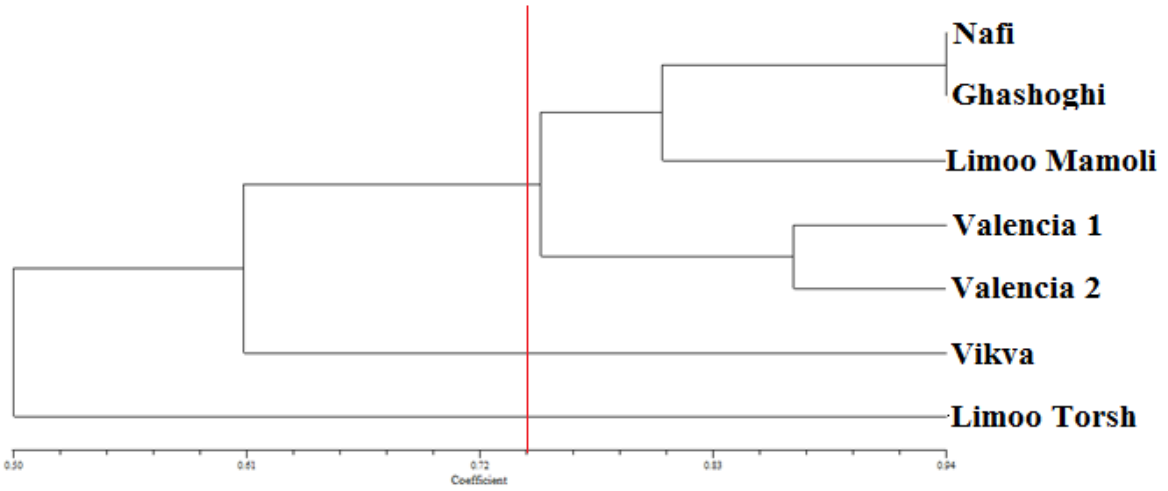
شکل ۸: دندروگرام حاصل از به کارگیری آنزیم *BsnI*

وجود این بیماری روی ارقام مختلف پرتقال نیز گزارش گردید. نتایج نشان داد که تمامی جدایه های مورد بررسی در اثر تلقیح روی برگ توانایی بیماری زایی داشتند. این نتایج با نتایج به دست آمده توسط گل محمدی (Gol Mohammadi) و همکاران در سال (۲۰۰۶) مطابقت دارد (۳۱). این محققین قارچ *آلترناریا آلترناتا* را از ارقام نارنگی مینولا تانجلو، دانسی، فورچون، پونکن و پیچ جداسازی و گزارش نمودند که تمامی جدایه ها روی برگ های مینولا تانجلو و پیچ بیماری زا بودند. همچنین این محققین به بررسی حساسیت ارقام مختلف مرکبات به *آلترناریا آلترناتا* پرداختند. محققین یاد شده گزارش نمودند که در شرایط باغی ارقام مرکبات مجاور درختان آلوده نارنگی ، هیچ علایمی مشاهده نشد. اما از راه تلقیح در شرایط آزمایشگاهی تعدادی واکنش مثبت به بیماری نشان داده شد. در مطالعه حاضر وجود بیماری *آلترناریا آلترناتا* در شرایط باغی روی سایر ارقام مرکبات (پرتقال) علاوه بر نارنگی مشاهده گردید. در این پژوهش روابط تکاملی بین جدایه های قارچ *آلترناریا آلترناتا* مرکبات از نظر توالی یابی ناحیه ITS1 مورد بررسی قرار گرفت.

www.SID.ir



شکل ۹: دندروگرام حاصل از به کارگیری آنزیم *HinfI*



شکل ۱۰: ترسیم دندروگرام پس ازکاربرد ۵ آنزیم برش دهنده بر روی ناحیه IGS جدایه های *آلترناریا آلترناتا* مرکبات

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تفاوت هائی ژنتیکی در این ناحیه ژنومی بین جدایه های مختلف قارچ های جداسازی شده از ارقام مختلف مرکبات وجود دارد. این امر بیانگر وجود تفاوت های درون گونه ای در جدایه های این قارچ می باشد. همان گونه که در نتایج نیز بیان شد جدایه پرتقال قاشقی از لحاظ توالی یابی این ناحیه ژنومی در یک گروه متمایز قرار گرفت. بنابراین چنین به نظر می رسد که تفاوت های ژنتیکی موجود در این ناحیه ژنومی تا حدودی به نوع میزبان نیز وابسته است و شاید یک اختصاصیت میزبانی بین جدایه های مورد بررسی وجود داشته باشد. هر چند که در تحقیق حاضر ارتباط قوی بین نوع میزبان و توالی یابی ناحیه ITS1 ژنومی مشاهده نگردید. وجود تفاوت های ژنتیکی در این ناحیه بیانگر وجود موتاسیون در این ناحیه در بین جدایه های مختلف این قارچ می باشد. انجام موتاسیون در این ناحیه ژنومی توسط سایر محققین نیز گزارش گردیده است (۳۲).

نتایج توالی یابی این ناحیه ژنومی نشان داد که ناحیه ITS1 ناحیه مناسبی برای تایید کارهای مورفولوژیکی در رابطه با شناسایی گونه می باشد. اما براساس توالی یابی این ناحیه نمی توان مشکلات مربوطه به تفاوت های مورفولوژیکی در بین جدایه های این قارچ را حل نمود. این مطلب قبلاً هم توسط

www.SID.ir

سایر محققین گزارش شده است (۳۳).

به منظور بررسی تفاوت های ژنتیکی گونه های بسیار مشابه به یکدیگر و همچنین تفاوت های ژنتیکی موجود در جمعیت یک گونه بسیاری از قارچ ها از توالی یابی ناحیه IGS و بررسی الگوهای برشی حاصل از آنزیم های مختلف در این ناحیه ژنتیکی استفاده گردیده است (۳۷-۳۴).

نتایج حاصله از این تحقیقات نشان داده که این ناحیه ژنومی ناحیه ای با تغییرات زیاد می باشد. در تحقیق انجام گرفته چندشکلی طولی زیادی بین جدایه های مورد بررسی مشاهده نگردید به جز جدایه پرتقال نافی که اندازه باند ناشی از تکثیر ناحیه IGS آن ۳۰۰۰ جفت بازی بود که نسبت به سایر جدایه ها متفاوت بود. در دنیا تاکنون تحقیقی در رابطه با بررسی چند شکلی طولی در ناحیه IGS جدایه های *آلترناریا آلترناتا* مرکبات گزارش نشده است. از این رو تحقیق حاضر اولین گزارش در رابطه با این موضوع می باشد. اما وجود چندشکلی طولی در بین گونه های مختلف جنس *آلترناریا* گزارش گردیده است (۳۸). همچنین وجود چندشکلی طولی بسیار محدودی در ناحیه IGS در رابطه با جدایه های مختلف گونه *آلترناریا آلترناتا* جداسازی شده از میزبانان مختلف غیر از مرکبات گزارش گردیده است (۲۱).

از آنجایی که چند شکلی های طولی در ناحیه IGS مربوط به وجود پدیده حذف و اضافه شدن نوکلوتیدها و همچنین انجام موتاسیون در این ناحیه است، بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که در بین جدایه های مختلف قارچ *آلترناریا آلترناتا* مرکبات پدیده هایی مانند حذف و اضافه شدن نوکلوتیدها در این ناحیه صورت گرفته است. دندروگرام حاصل از الگوهای برشی آنزیم های مورد بررسی در این تحقیق نشان داد که یک ارتباط منطقی بین میزان رشد جدایه های مختلف و گروه بندی آنها وجود دارد. به طوری که جدایه لیموشیرین ویکوا که دارای بیشترین میزان رشد در محیط کشت بود در دندروگرام حاصل در یک گروه متمایز قرار گرفت و جدایه های پرتقال نافی و قاشقی که دارای کمترین میزان رشد در محیط کشت بودند نیز در یک گروه قرار گرفت و نسبت به سایر جدایه ها متفاوت بودند. همچنین جدایه های پرتقال همگی در یک گروه متمایز و جدایه های لیموشیرین ویکوا و لیموترش در دو گروه متمایز قرار گرفتند. به عبارت دیگر الگوهای آنزیم های برشی ناحیه IGS توانست جدایه ها را برحسب نوع میزبان از یکدیگر متمایز نماید.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که به کارگیری الگوهای حاصل از برش آنزیمی ناحیه IGS می تواند تا حدودی مشکل مربوط به طبقه بندی جدایه های قارچ *آلترناریا آلترناتا* مرکبات بر حسب نوع میزبان را که در حال حاضر مورد بحث بسیار زیادی می باشد را تاحدودی حل نماید. هر چند تحقیقات بیشتری در رابطه با استفاده از تعداد زیادتری از آنزیم های برشی و همچنین استفاده از جدایه های بیشتری برای اثبات این موضوع لازم است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای مهندس نوروزنژاد، کارشناس بخش بیماری شناسی گیاهی و تمامی مسئولین دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به دلیل همکاری صمیمانه در این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Fao: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012. FAO statistical yearbook**.**

2. Annamous: Statics of Agriculture. In., vol. 2. Tehran: Minestry of agriculture; 2000: 275. [In Persian]

Archive of SID
www.SID.ir

3. Timmer LW, Solel Z, Gottwald TR, Ibanez AM, Zitko SE. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. Phytopathol. 1998; 88(11):1218-1223.

4. Gol Mohammadi M, Rahimian H, Bani HS, Taheri H. Occurrence of brown spot disease of page mandarin in West of Mazandaran. J Agr Sci Nat Resour. 2005; 12(4): 116-124. [In Persian]

5. Peever TL, Ibanez A, Akimitsu K**,** Timmer LW. Worldwide phylogeography of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. Phytopathol. 2002; 92(7): 794-802.

6. Takamatsu S, Hirata T, Sato Y. Phylogenetic analysis and predicted secondary structures of the rDNA internal transcribed spacers of the powdery mildew fungi (Erysiphaceae). Mycoscience. 1998; 39(4): 441-453.

7. Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q Rev Biol. 1991:411-453.

8. Anderson JB, Stasovski E. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. Mycologia. 1992; 84(4): 505-516.

9. Henrion B, Le Tacon F, Martin F. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. New Phytol. 1992; 122(2): 289-298.

10. Edel V, Steinberg C, Avelange I, Laguerre G, Alabouvette C. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. Phytopathol. 1995; 85(5): 579-585.

11. Banik MT, Volk TJ, Burdsall Jr HH. *Armillaria* species of the Olympic Peninsula of Washington state, including confirmation of North American biological species XI. Mycologia. 1996; 88(3): 492-496.

12. Guidot A, Lumini E, Debaud JC, Marmeisse R. The nuclear ribosomal DNA intergenic spaces as a target sequence to study intraspecific diversity of the ectomycorrhizal basidiomycete Hebeloma cylindrosporum directly on Pinus roof systems. Appl Environ Microb. 1999; 65:903-909.

13. Molina FI, Jong S-C, Huffman JL. PCR amplification of the 3' external transcribed and intergenic spacers of the ribosomal DNA repeat unit in three species of Saccharomyces. FEMS Microbiol Lett. 1993; 108(3): 259-263.

14. Selosse MA, Costa G, Battista CD, Tacon FL, Marfin F. Meiotic segregation and recombination of the intergenic spacer of the the ribosomal DNA of the oomycetous fungus *Pythium ultimum*. Curr Genet. 1996; 17: 125-127.

15. Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. J Bacteriol. 1990; 172(8): 4238-4246.

16. Chen W. Restriction fragment length polymorphism in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Pythium* species. Phytopathol. 1992; 82(12): 1467-1472.

17. Edel V, Steinberg C, Gautheron N, Alabouvette C. Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. Mycol Res. 1997; 101(2): 179-187.

18. Simmons EG. Alternaria: an identification manual. Am Soc Microbiol. 2007; 51: 687.

Archive of SID

www.SID.ir

19. Stewart Jr CN, Via LE. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. Biotechnique. 1993; 14(5): 748-750.

20. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR protocols: a guide to methods and applications: Academic press; 1990**.**

21. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Edited by Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. San Diego, CA: Academic Press; 1990: 315-322**.**

22. Hong SG, Cramer RA, Lawrence CB, Pryor BM. Alt a 1 allergen homologs from Alternaria and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. Fungal Genet Biol. 2005; 42(2): 119-129**.**

23. Ershad D. Fungi of Iran. Publications Department of botany 1995; 10: 277. [In Persian]

24. Rouhibakhsh A, Ershad D. An investigation on mycoflora of citrus necrotic spots in Western part of Mazandaran. Iranian J Plant Pathol. 1997; 33:94-110. [In Persian]

25. Banihashemian S, Zad J, Hedjaroud GA, Okhovvat SM, Mosahebi GH. Albinism in citrus seedlings. Iranian J Agric Sci. 2001; 32(2): 345-354. [In Persian]

26. Kohmoto K, Akimitsu K, Otani H. Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. Phytopathology 1991, 81(7): 719-722**.**

27. Kohmoto K, Scheffer RP, Whiteside JO. Host-selective toxins from *Alternaria citri* [from lemon and tangerine trees in Florida]. Phytopathol. 1979; 69: 667-671.

28. Palm ME, Civerolo EL. Isolation, pathogenicity, and partial host range of *Alternaria limicola*, causal agent of mancha foliar de los citricos in Mexico. Plant Dis. 1994; 78(9): 879-883.

29. Peever TL, Olsen L, Ibanez A, Timmer LW. Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria* spp. causing brown spot of grapefruit and tangerine and grapefruit hybrids in Florida. Phytopathol. 2000; 90(4): 407-414.

30. Timmer LW, Peever TL, Solel Z, Akimitsu K. *Alternaria* diseases of citrus-novel pathosystems. Phytopathol Mediterr. 2003; 42(2): 99-112.

31. Golmohammadi M, Andrew M, Peever TL, Peres NA, Timmer LW. Brown spot of tangerine hybrid cultivars Minneola, Page and Fortune caused by *Alternaria alternata* in Iran. Plant Pathol. 2006; 55(4): 578-587.

32. Peay KG, Kennedy PG, Bruns TD. Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. Bioscience. 2008; 58(9): 799-810.

33. Pryor BM, Michailides TJ. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. Phytopathol. 2002; 92 (4): 406-416.

34. Appel DJ, Gordon TR. Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium* oxysporum based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. Mol Plant Microbe. 1996; 9(2): 125-138.

Archive of SID

www.SID.ir

35. Pecchia S, Mercatelli E, Vannacci G. PCR amplification and characterization of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA in *Pyrenophora graminea*. FEMS Microbiol Lett. 1998; 166(1): 21-27.

36. Slippers B, Wingfield BD, Coutinho TA, Wingfield MJ. DNA sequence and RFLP data reflect geographical spread and relationships of *Amylostereum areolatum* and its insect vectors. Mol Ecol. 2002; 11(9): 1845-1854.

37. Pantou MP, Mavridou A, Typas MA. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. Fungal Genet Biol. 2003; 38 (2): 159-174.

38. Hong SG, Liu D, Pryor BM. Restriction mapping of the IGS region in *Alternaria* spp. reveals variable and conserved domains. Mycol Res. 2005; 109(1): 87-95.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 2, June 2013

Original Article

Evaluation of genetic variation of the causal agent of leaf spot of citrus (*Alternaria* sp.) isolates based on RFLP-IGS

Alireza Niazmand[1], Maryam Rahmani[2], Gilda Najafipour[1]

[1] Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom Iran.

[2] MS.c., Department of Plant Pathology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom Iran.

Abstract

Background and Objectives: Nowadays RFLP test from IGS region is a used for determination of interspecies diversities. The aim of this study was to determine pathogenic species of *Alternaria* from leaf spots of citrus in Mamasani region based on morphological and ITS1 sequencing and to determine genetic variation of isolates based on RFLP-IGS.

Materials and Methods: This descriptive study was performed on 70 leaf spotted samples collected from different citruses species and cultivars of Mamasany orchards including orange (Valencia, Navel and leaf spoon Cv.), lime and sweet lemon (Wikova and local Cv.) during In autumn 2011. The isolates were cultured on PDA medium and purified by using single spore method and their species were identified based on morphological characters. The pathogenicity of the isolates was evaluated by based on Koch's rules through exposure of isolates to leaf. DNA was extracted from mycelia by CTAB and the ITS1 and IGS regions were amplified by using specific primers. The ITS1 region was sequenced and the IGS region was digested by *Hinf*I, *Bsn*I, *Rsa*I, *Bssm*I *and Alu*I restricted enzymes.

Results: All isolates were identified as *Alternaria alternata* based on morphological characters and sequencing of ITS1 region. Constructed dendrogram based on RFLP patterns showed existence of three divergent groups in 51% similarity. Orange, lime and sweet lemon isolates grouped in divergent groups. Also Wikova isolates grouped in different clade.

Conclusion: The obtained results clearly showed that the enzyme patterns of IGS can reveal the classification defects of *Alternaria alternata* form citrus hosts.

Keywords: ITS1, *Alternaria alternata, Orange, Lime, Sweet lemon.*

Correspondance to: Alireza Niazmand

Tel: +989177104870

E-mail: niazmand2003@yahoo.com

Journal of Microbial World 2013, 6(2): 117-131.

Archive of SID

www.SID.ir