ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳
صفحه ۳۰- ۲۱

بررسی سازگاری میسلیومی جدایه‌های قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* عامل پوسیدگی سفید ساقه کلزا و ارزیابی تنوع ژنتیکی آنها با استفاده از نشانگر RAPD

Assessment of mycelial compatibility of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates, causal agent of canola stem white rot and evaluation of their genetic diversity using RAPD marker

فریبا کریمیان[۱]، سعید نصراله‌نژاد*[۱]، کامران رهنما[۱] ، میثم تقی‌نسب [۱]، اسداله احمدی‌خواه[۲]

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشیاران و مربی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- استادیار، دانشگاه شهید بهشتی تهران

Karimian F[1], Nasrollahnejad S[*1], Rahnama K[1], Taghinasab M[1], Ahmadikha A[2]

1. MSc Student, Associate Professors and Instructor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2. Assistant Professor, Shahid Beheshti University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: snasrollanejad@yahoo.com

(تاریخ دریافت:۹۱/۸/۱- تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۳۰)

چکیده

پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های کلزا در بسیاری از مناطق تولید این گیاه روغنی و با ارزش است. میزان بوته‌های بیمار در بعضی از مزارع تا ۸۰ درصد و میزان خسارت ناشی از آن، گاهی در مزارع با آلودگی شدید تا ۵۰ درصد عملکرد محصول نیز می‌رسد. این بیماری که عامل آن *Sclerotinia sclerotiorum* می‌باشد، بر روی کلزا، آفتابگردان و سایر گیاهان از قبیل کلم، کاهو، توتون، شب بو و تعدادی از گیاهان دیگر نیز باعث پوسیدگی ساقه و طوقه می‌شود. قارچ عامل بیماری، یکی از پلی‌فاژترین پاتوژن‌های گیاهی بوده و دارای دامنه میزبانی وسیعی است. در این تحقیق، ۱۹ گروه سازگار میسلیومی از ۳۳ نمونه عامل بیماری بر روی کلزا، کلم و آفتابگردان از مناطق مختلف استان در سال زراعی ۸۸-۱۳۸۷ جمع‌آوری و در محیط کشت PDA کشت داده شد و مورد بررسی مورفولوژیکی و مولکولی قرار گرفتند که در نتیجه از ۱۷۱ تلاقی انجام شده ایزوله‌های مختلف قارچ *S. sclerotiorum* ۲۱ تلاقی (۱۲/۳ درصد) دارای سازگاری و ۱۵۰ تلاقی (۸۷/۷ درصد) دارای ناسازگاری میسلیومی بودند. هم‌چنین برای بررسی تنوع مولکولی جدایه‌های به دست آمده، از ۸ آغازگر RAPD در واکنش PCR استفاده شد که ۱۳۶ نشانگر چندشکل پس از الکتروفورز در ژل آگارز به‌دست آمد. تجزیه داده‌های مولکولی با نرم‌افزار POPGENE32 نشان داد که در بین جدایه‌های مورد بررسی، تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی وجود دارد. به علاوه مشخص شد که شباهت‌ها و فواصل ژنتیکی، با دور یا نزدیک بودن فاصله مکانی نمونه‌های جمع‌آوری شده ارتباط ندارد. با توجه به آزمون تعادل هاردی- واینبرگ، می‌توان گفت جمعیت مورد مطالعه درتمام مکان‌های ژنی مورد بررسی در حال تعادل بوده است؛ علت این امر را می‌توان جوان بودن زراعت کلزا در استان گلستان، میزبان‌های فراوان این قارچ (از جمله علف‌های هرز) و یا شاید تنوع کم ارقام تحت کشت کلزا در منطقه طی چند سال اخیر ذکر کرد.

واژه‌های کلیدی
تنوع ژنتیکی
قارچ اسکلروتینیا
کلزا
گروه‌های سازگار میسلیومی
RAPD

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه ناشی از قارچ *S. sclerotiorum (lib) de bary* یکی ازعوامل بیماریزای گیاهی با دامنه و توزیع وسیع میزبانی و جغرافیایی و یکی از مهمترین بیماری‌های کلزا و سایر گیاهان پهن برگ در مناطق تولید این گیاه روغنی و با ارزش می‌باشد. اولین گزارش این بیماری در کلزا و خردل مربوط به کشور هند می‌باشد. سپس بارها به صورت شدید از کشورهای دانمارک، فنلاند، برزیل، چین، هند، کانادا، سوئد، آلمان، فرانسه، انگلستان و ایتالیا گزارش شده است (Boland and Hall 1994). میزان بوته‌های بیمار در بعضی از مزارع کلزا تا ۸۰ درصد و میزان خسارت ناشی از آن گاهی در مزارع با آلودگی شدید تا ۵۰ در صد عملکرد محصول می‌باشد (Chang and Kozub 1994). این بیماری با توجه به علائمی که ایجاد می‌کند به نام‌های مختلف از قبیل بلایت سفید، پوسیدگی سفید، پوسیدگی ساقه، بلایت ساقه، شکستگی ساقه، شانکر ساقه یا شانکر کلزا نامیده شده است. معمولاً در شرایط طبیعی بیشتر آلودگی ساقه مشاهده می‌شود، هرچند تمام اندام‌های هوایی گیاه نیز ممکن است مورد حمله قرار گیرند. علائم روی ساقه به صورت لکه‌های کشیده و آب‌سوخته ظاهر می‌شود که بعداً میسلیوم پنبه مانند قارچ روی آنها را می‌پوشاند. علائمی چون کلروزیس و پژمردگی برگ‌ها و نکروز پایه ساقه‌ها نیز از علائم این بیماری است که در مرحله پیشروی بیماری، ساقه‌ها سفید شده و سرانجام می‌میرند (Gaetn and Madina 2005). ساقه آلوده ممکن است شکافته شود، در این صورت تعداد زیادی سختینه منظم، کروی سفید خاکستری تا سیاه در داخل بافت ساقه ایجاد می‌شود که از علائم بارز این عامل بیمارگر می‌باشد. در هوای مرطوب این سختینه ها ممکن است بر روی ساقه و یا غلاف‌ها نیز پدید آیند (Purdy 1975; Kolte 1985).

مهم‌ترین محصولات مورد حمله این قارچ شامل سویا، آفتابگردان، کلزا، بادام‌زمینی، توتون و سبزیجاتی چون کاهو، لوبیا، هویج، سیب‌زمینی، کلم، کرفس، کدو، هندوانه، یونجه، شبدر و دیگر بقولات علفی و تعدادی گیاهان زینتی می‌باشند. این قارچ در ایران علاوه بر کلزا از روی نخود و توت‌فرنگی (دزفول)، آفتابگردان (مازندران، کردستان، آذربایجان)، کاهو (اهواز و اندیمشک)، گوجه‌فرنگی (زنجان)، توت (گیلان) و بادمجان (زنجان) گزارش شده است (Ershad 1995).

سیستم سازگاری- ناسازگاری میسلیومی روش ماکروسکوپی بوده که از روش خودی- غیر خودی و خودی- خودی[1] جدایه‌ها استفاده می‌کند، که در حالت سازگاری دو جدایه ادغام شده و تشکیل یک پرگنه را می‌دهند. اما در حالت ناسازگار پرگنه‌های هر جدایه با تشکیل یک سری از سلول‌های مرده بین دو پرگنه قابل تفکیک هستند. این روش در قارچ‌ها معمول بوده و علاوه بر *S. sclerotiorum* در مطالعات قارچ‌های دیگر از جمله *Cryphonectria parasitica* و عامل بیماری مرگ نارون (*Ophiostoma ulmi*) به عنوان روش موثر برای تشخیص و ارزیابی تنوع درون گونه‌ای در جمعیت عامل بیماری‌زا شناسایی شده است (Kull et al. 2004). با توجه به این که تشخیص هتروژنی گروه‌های درون گونه‌ای قارچ بر اساس فاکتورهای فنوتیپی گروه‌ها همچون بیماری‌زایی و یا پراکنش جغرافیایی محدود می‌باشد، بنابراین وجود معیارهای مستقلی برای تفکیک و طبقه‌بندی هتروژنی درون گونه‌ای ضروری است (Kohen et al. 1990; Kohen et al. 1991). در سال ۱۹۹۹ تحقیقی بر روی مقایسه ژنتیکی انواع اسکلروتینیاها با استفاده از نشانگرهای مولکولی RFLP و RAPD و آنالیز DNA ریبوزومی بر روی نمونه‌های جداشده عامل بیماری‌زای آفتابگردان در استرالیا و کانادا انجام شد (Letourmeau 1979) که نشان داد بین جدایه‌های مختلف تنوع ژنتیکی وجود دارد. همچنین در سال ۱۳۸۴، در ایران نیز تحقیقی بر روی تنوع ژنتیکی قارچ اسکلروتینیا اسکلروشیوروم انجام شد که با استفاده از نشانگرهای مولکولی RFLP و RFLP-PCR، نشان داده شد که در بین برخی از جدایه-های عامل قارچ اسکلروتینیا اسکلروشیوروم بر روی کلزا تنوع وجود دارد (Karimi et al. 2010). در سال ۱۹۹۶ تحقیقی بر روی مقایسه ژنتیکی عامل قارچی اسکلروتینیا اسکلروشیوروم جداشده از مزارع نیوزیلند و آمریکا انجام شد. هدف از اجرای این تحقیق امکان استفاده از این قارچ برای کنترل بیولوژیکی علف‌های هرز در نیوزیلند بود و از نشانگرهای مولکولی RAPD و آنالیز DNA ریبوزومی جهت تعیین تنوع استفاده شد (Noonan et al. 1996).

[1] Self-nonself and self-self

Archive of SID
www.SID.ir

آنالیز جدایه‌های جمع‌آوری شده گیاه کلزا آلوده در اونتاریو تا شمال آلبرتا کانادا نشان داد که این جدایه‌ها از نظر ژنتیکی هتروژن و با تعدادی کلون قابل تشخیص هستند. این کلون‌ها سبب تفکیک‌ژنتیکی و جداسازی‌ژنوتیپی درون گونه‌ای می‌شود. تفکیک و جداسازی کلون‌ها بر اساس گروه‌های سازگار میسلیومی و انگشت‌نگاری DNA صورت گرفت و نشان داده شد که همه اعضای یک کلون با هم سازگاری میسلیومی دارند و با اعضا کلون‌های دیگر ناسازگاری دارند و هم‌چنین انگشت نگاری DNA یکسانی دارند (Bardin and Huang 2001).

در گذشته بررسی تنوع‌ژنتیکی از طریق بررسی صفات مورفولوژیک یا بیوشیمیایی انجام می‌شد. اما، استفاده از ارزیابی فنوتیپی به دلیل تاثیر محیط بر بیان‌ژن ممکن است روش قابل اعتمادی برای تعیین تفاوت‌های ژنتیکی نباشد. در عوض، بررسی DNA امکان ارزیابی مستقیم تنوع ژنتیکی را فراهم می‌کند. از روش‌های گوناگونی برای بررسی DNA در ارزیابی تنوع ژنتیکی استفاده شده است. نوع روش مولکولی مورد استفاده برای اندازه-گیری فاصله‌های ژنتیکی به میزان تفاوت‌های ژنتیکی در حال ارزیابی بستگی دارد (Ahmadikhah 2008).

یکی از روش‌های آشکارسازی چندشکلی ژنتیکی در گیاهان استفاده از نشانگر RAPD یا چندشکلی حاصل از تکثیر تصادفی DNA می‌باشد (Williams et al. 1990 ; Welsh and Mc Clleland 1990). این روش مبتنی بر واکنش زنجیره پلیمراز با یک آغازگر تصادفی الیگونوکلئوتیدی به طول ۹ تا ۱۰ باز می‌باشد (Welsh and Mc; Clleland 1990 Williams et al. 1990). این آغازگرها دارای ۸۰-۶۰ درصد باز G/C می‌باشند و دمای اتصال نیز برای آن‌ها تا اندازه‌ای پایین می‌باشد. این روش هم اکنون کاربرد وسیعی در تعیین تنوع ژنتیکی دارد. معمولا آغازگرها با طول ۱۰-۹ نوکلئوتید اجازه تکثیر ۱۵-۳ باند را می‌دهند (Weeden et al. 1993; Rus-Kurtekaas et al. 1994; Jones et al. 1999). قطعات DNA تکثیر یافته با روش RAPD در سراسر ژنوم توزیع یافته است و می‌تواند توالی‌های منحصر به فرد و تکراری را شامل شود (Williams et al. 1990). مزیت این روش در سادگی تکنیک و سریع بودن آن می‌باشد که ناشی از توالی آغازگرهای تصادفی است. این روش نیازمند اطلاعات در مورد توالی DNA نیست و تحت تاثیر کیفیت DNA قرار نمی‌گیرد (Jones et al. 1999; Virk et al. 2000). این روش به مواد رادیواکتیو نیاز ندارد و نسبتاً ساده است (Tingey et al. 1992; Weeden et al. 1993). مزیت مهم تکنیک RAPD امکان انجام آزمون هم‌زمان فراوانی چند مکان ژنی و انجام مقایسه کلی ژنوم-ها برای مطالعات مختلف می‌باشد (Ahmadikhah 2008).

قارچ *S. sclerotiorum* برای بیش از ۱۵۰ سال مورد مطالعات مختلف بیولوژیکی، علائم شناسی، بیماری‌زایی و مورفولوژی قرار گرفته است. هر چند این تلاش‌ها اطلاعات زیادی در مورد این قارچ فراهم آورد، ولی در مورد تنوع ژنتیکی، شناسایی و مقایسه سویه‌های آن اطلاعات چندانی در دست نیست. هدف از این تحقیق بررسی سازگاری میسلیومی و همچنین تفاوت ژنتیکی بین ایزوله‌های گونه قارچ عامل بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا (*S. sclerotiorum*) در استان گلستان بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

کلیه نمونه‌ها در این بررسی از اسکلروت و یا ساقه‌های کلزا، آفتابگردان و کلم آلوده به بیماری جمع‌آوری شدند که از سال گذشته (۱۳۸۷) و یا سال ۱۳۸۸ از شهرستان‌های مختلف استان گلستان شامل گرگان، گنبد، کلاله، بندرترکمن، کردکوی، علی‌آباد و مینودشت، آق‌قلا، آزادشهر، رامیان و بندرگز به دست آمده بودند. نمونه‌ها در دمای ۴°C در یخچال نگهداری شدند.

رقم‌های کلزا تحت کشت در سال زراعی ۸۸-۱۳۸۷ شامل هایولا ۴۰۱ و هایولا ۴۲۰ و رقم ۴۸۱۵ بودند [رقم اخیر یکی از ارقام جدید است که در سطح بسیار محدودی در روستای نصرت‌آباد شهرستان علی‌آباد کشت می‌شود].

کشت و جداسازی

ابتدا نمونه‌ها در محلول ده درصد هیپوکلریت‌سدیم (وایتکس تجارتی) به مدت ۱/۵ دقیقه غوطه‌ور شده و سپس با آب مقطر استریل سه بار شستشو داده شدند و برای خشک کردن نمونه‌ها از کاغذ خشک‌کن استریل استفاده شد (عملیات در زیر هود استریل انجام شد). جهت آماده کردن محیط کشت، از پودر PDA[1] (۳۹

[1] Potato dextrose agar

Archive of SID
www.SID.ir

گرم در لیتر) آماده استفاده شد. جهت جلوگیری از آلودگی میکروبی از اسیدلاکتیک (۱۵ قطره در لیتر) (Greer and Dilts 1995) و کلرامفنیکل (۱۰۰ میلی‌لیتر در لیتر) استفاده شد و سپس نمونه‌ها در محیط کشت PDA به طور جداگانه در پتری‌دیش با قطر ۱۰ سانتی‌متر کشت شد. پس از سه روز، قطعات منظم ۵ میلی‌متری از هر یک از نمونه‌های رشد یافته به پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت‌های جدید انتقال داده شدند. پس از رشد میسلیوم‌ها برای تولید انبوه میسلیوم از محیط کشت PDB[1] در شیکر در دمای ۲۲°C به مدت چهار روز استفاده شد. در شروع آزمایش برای تشکیل نوک ریسه[2] تک رشته میسلیومی از محیط کشت PDA به محیط کشت آب آگار منتقل شد. نمونه‌ها مکررا در محیط کشت PDB جهت تولید میسلیوم کشت و پس از دو هفته که تمام سطح پلیت را اشغال کرد، به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم جمع‌آوری و بلافاصله برای استخراج DNA استفاده شد.

بررسی سازگاری در بین جدایه‌های قارچ *S. sclerotiorum* برای تشخیص سازگاری و یا عدم سازگاری جدایه‌های مختلف قارچ، روی محیط کشت PDA در پتری دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری دو نمونه ۴ میلی‌متری از جدایه‌های قارچ *S. sclerotiorum* به فاصله ۸ سانتی‌متر در مقابل هم قرار داده شدند که پس از گذشت ۱۰ روز و رشد میسلیوم‌ها، جدایه‌هایی که با هم سازگاری داشتند، رشته‌های یکسانی را تشکیل داده و مرزی بین آنها تشکیل نشد. به این گروه از میسلیوم‌ها گروه‌های سازگار میسلیومی می‌گویند و میسلیوم جدایه‌هایی که با هم سازگاری نداشتند، مابین آنها مرزی تشکیل و میسلیوم‌ها قبل از رسیدن به قلمرو جدایه مقابل به سمت داخل حیطه پس می‌زدند، و یا در محل رسیدن میسلیوم‌ها جفت می‌شدند. به این گروه از میسلیوم‌ها گروه‌های ناسازگار میسلیومی می‌گویند.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و الکتروفورز استخراج DNA با روش CTAB (Saghai-Maroof et al. 1984) انجام شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از کیت شرکت سیناکلون (PCR Master Mix, CinnaClone) استفاده شد. به این منظور، برای تهیه یک واکنش ۱۲/۵ میکرولیتری، ۶/۲۵ میکرولیتر از PCR Master Mix، ۵/۵ میکرولیتر H_2O دیونیزه، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر RAPD (جدول۱) و ۰/۷۵ میکرولیتر از DNA نمونه (با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) در یک میکروتیوب اضافه شد. پس از قرار دادن میکروتیوب‌ها در دستگاه PCR، دمای اتصال آغازگرها در واکنش PCR به شرح جدول۱ تنظیم شد.

برای الکتروفورز محصولات PCR، از ژل آگارز یک درصد و بافر ۱X TBE استفاده شد. جهت آشکار کردن باندها در زیر اشعه UV از ماده اتیدیوم بروماید به میزان ۰/۵ میکرگرم در میکرولیتر استفاده شد. ولتاژ دستگاه در ۱۰۰ ولت تنظیم شد و به مدت یک ساعت و چهل و پنج دقیقه الکتروفورز شد.

جدول۱- آغازگرهای RAPD مورد استفاده و برنامه حرارتی PCR با ۳۵ چرخه تکثیر

نام آغازگر	توالی آغازگر (´۵ به ´۳)	دمای اتصال (°C)
OPC04	CCGCATCTAC	۳۰
OPB07	GGTGACGCAG	۳۵/۳
OPA02	TGCCGAGCTG	۴۲/۴
OPD02	GGACCCAACC	۳۶/۸
OPC05	GATGACCGCC	۳۸/۸
OPB03	CATCCCCCTG	۳۸/۶
OPC10	TGTCTGGGTG	۳۲
OPC01	TTCGAGCCAG	۳۵/۸

امتیازدهی به الگوهای باندی و تجزیه داده‌های مولکولی

حضور یا عدم حضور هر باند RAPD به ترتیب به صورت یک و صفر امتیازدهی شد. جهت تجزیه داده‌های مولکولی از نرم‌افزار POPGENE32 (Yeh et al. 1999) استفاده شد. در این نرم‌افزار، معیارهای متعددی از جمله: تعداد آلل مشاهده شده، تعداد آلل موثر، فراوانی آللی، ضریب تنوع ژنی نئی و شاخص تنوع شانون برآورد شد. شباهت‌های ژنتیکی با استفاده از روش Nei and Li (1979) مورد بررسی قرار گرفت و جدول ماتریس شباهت‌های جدایه‌های مورد مطالعه، به دست آمد. گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس ضریب تشابه نئی با روش جفت گروه‌های غیر هم‌وزن

[1] Potato dextrose broth
[2] Hyphal tip

Archive of SID
www.SID.ir

(UPGMA)[1] تعیین شد. از میانگین فاصله ژنتیکی جهت تعیین خط برش و تشخیص کلاسترها استفاده شد (Malone et al. 2009). آزمون تعادل آللی جمعیت در هر جایگاه آللی (آنالیز تعادل هاردی- واینبرگ) با استفاده از فرمول کای مربع محاسبه شد. میزان اطلاعات چند شکلی هر آغازگر (PIC) از رابطه زیر محاسبه شد:

$PIC= 1-\sum P_{ij}^{2}$

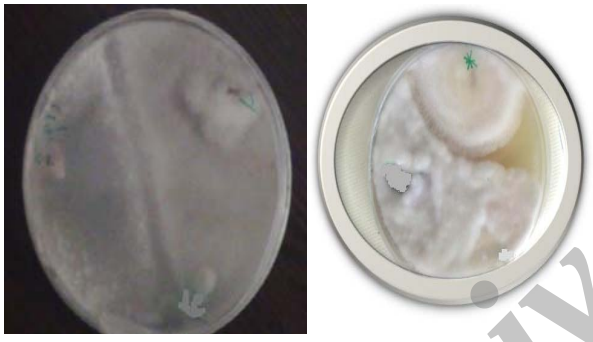
که در آن P_{ij} فراوانی آلل iام مربوط به فرد jام می‌باشد.

نتایج و بحث

در بررسی سازگاری و ناسازگاری جدایه‌ها، سه نوع متفاوت از سازگاری- ناسازگاری شامل عدم سازگاری نوع یک (تشکیل مرز مشخص)، عدم سازگاری نوع دو (تشکیل مرز شفاف و توده‌های میسلیومی متفاوت) (شکل۱) و سازگاری میسلیومی (همراه با ادغام میسلیوم‌های بین دو نمونه) (شکل ۲) مشاهده شد. نتایج حاصل از ادغام میسلیومی بین ۱۹ جدایه در جدول۲ نشان داده شده است. اصطلاح ادغام میسلیومی بدین مفهوم است که دو جدایه تشکیل یک پرگنه داده و ناحیه واکنش مشخصی بین دو جدایه دیده نمی‌شود. بررسی‌های انجام شده نشان داد که از ۱۷۱ تلاقی حاصل از کشت دو به دوی میسلیوم‌های قارچ، غیر از ۲۱ تلاقی خودی که دارای سازگاری میسلیومی بودند و پرگنه‌ها تمام سطح پتری‌دیش را می‌پوشاندند، ۱۵۰ تلاقی مربوط به تلاقی غیر خودی بود و ناسازگاری میسلیومی نشان دادند.

شکل۱- نمونه‌های کشت قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* بر روی محیط کشت PDA پس از۷ روز.

جدایه‌های چهل‌دین و انار آیش و کَلاله هیچ‌گونه سازگاری با دیگر جدایه‌ها نشان ندادند و جدایه محمدآباد از میزبان کلم کمترین سازگاری را با دیگر جدایه‌ها نشان داد. همچنین جدایه گلیداغ (جمع شده از روی آفتابگردان) با دو جدایه از کلزا (رقم-های ۴۸۱۵ و هایولا ۴۰۱) جمع‌آوری شده از علی‌آباد سازگاری نشان داد، اما با دیگر جدایه‌ها ناسازگاری نشان داد. بیش‌ترین سازگاری مربوط به جدایه‌های جمع‌آوری شده از روی کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (منطقه مینودشت)، کلم (منطقه محمدآباد)، کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (مناطق اسبومحله و فاضل‌آباد)، کلزا رقم هایولا ۴۲۰ و کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (مناطق آزادشهر، بندرترکمن و کردکوی) و همچنین کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (منطقه اسبومحله) بوده است (جدول ۲).



شکل ۲- بررسی سازگاری ریسه‌ها. عدم سازگاری باتشکیل مرز شفاف (چپ)؛ عدم سازگاری با تشکیل مرز مشخص در کشت متقابل (راست).

دراین تحقیق هفده گروه سازگار میسلیومی (MCG) از نمونه‌های کلزای آلوده به عامل بیماری، به همراه یک نمونه از آفتابگردان و یک نمونه از کلم (در مجموع نوزده MCG؛ جدول۲) با ۱۱ آغازگر RAPD (جدول۱) مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند. در میان این آغازگرها ۸ آغازگر OPC01، OPB03، OPA02، OPC10، OPD02، OPB07، OPC04 و OPC05 الگوی باندی مناسب و قابل امتیازدهی تولید کردند.

اندازه باندهای تشکیل شده بر روی ژل الکتروفورز افقی، بین ۲۷۵ تا ۳۰۰۰ جفت باز بود که نمونه‌ای از آن در شکل ۳ نشان داده شده است.

[1] Unweighted pair grouped method by arithmetic average

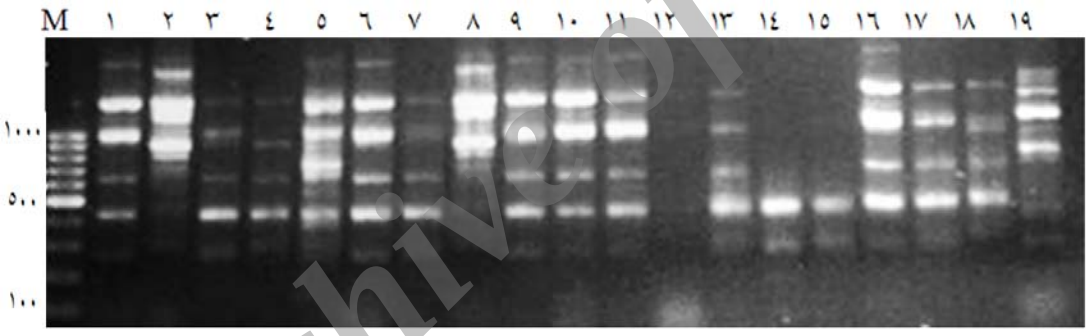
Archive of SID
www.SID.ir

جدول۲- نتیجه تلاقی میسلیومی بین جدایه‌های قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* از مناطق و میزبان‌های مختلف در مزارع استان گلستان.

		1B	کلم	چهل دین(۲)	۴۸۱۵	اسبومحله ۴۲۰(۱)	F	Ka	8	آفتابگردان	A	سرکلاته ۴۲۰	اسبومحله ۴۲۰	*	14	3	16	علی آباد	اسبومحله ۴۰۱
۱	1B																		
۲	کلم	Ö																	
۳	چهل‌دین(۲)	ø	ø																
٤	4815	ø	ø	ø															
٥	اسبومحله ۴۲۰(۱)	Ö	ø	ø	ø														
٦	F	ø	ø	ø	ø	ø													
٧	Ka	ø	ø	ø	ø	ø	ø												
٨	8	Ö	ø	ø	ø	ø	Ö	ø											
٩	آفتابگردان	ø	ø	ø	Ö	ø	ø	ø	ø										
١٠	A	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø									
١١	سرکلاته ۴۲۰	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø								
١٢	اسبومحله ۴۲۰	Ö	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø							
١٣	*	Ö	ø	ø	ø	Ö	ø	ø	ø	ø	ø	ø	o						
١٤	14	Ö	ø	ø	ø	ø	Ö	ø	Ö	ø	ø	ø	ø	ø					
١٥	3	Ö	ø	ø	Ö	ø	ø	ø	ø	ø	ø	Ö	ø	ø	ø				
١٦	16	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	Ö	ø	ø	ø	ø	ø			
١٧	علی‌آباد	ø	ø	ø	Ö	ø	ø	ø	ø	Ö	ø	ø	ø	ø	Ö	ø	Ø		
١٨	اسبومحله ۴۰۱	Ö	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	Ö	ø	ø	ø	ø	
١٩	انارآبش	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø

Ö نشان دهنده سازگاری میسلیومی و Ø نشان دهنده عدم سازگاری میسلیومی می‌باشد.

شکل۳- الگوی باندهی ۱۹ جدایه با نشانگر OPC05. شماره‌ها مطابق با شماره ایزوله‌های مندرج در جدول۲ می‌باشد. M) نشانگر اندازه مولکولی bp ۱۰۰.



در کل، ۱۳۸ جایگاه آللی توسط ۸ آغازگر تکثیر شدند که ۱۳۶ عدد از آنها چندشکل بودند (جدول۳). آغازگر OPB03 کمترین تعداد باند (۱۲ باند) و آغازگرهای OPA02 و OPB07 بیشترین تعداد باند (۲۰ باند) را تولید کردند. به طور متوسط هر آغازگر تعداد ۱۷/۲۵ باند تولید کرد. پایین‌ترین و بالاترین درصد محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) به ترتیب مربوط به آغازگرهای OPC04 (۲۸/۸۵ درصد) و OPD02 (۴۲/۶۲ درصد) بود. بیشترین و کمترین تعداد آلل موثر مربوط به آغازگرهای OPD02 و OPC04 و میانگین تعداد آلل‌های موثر در این تحقیق ۱/۵۶ بوده است (جدول۴). میانگین ضریب تنوع ژنی نئی حدود ۳۳/۵ درصد و میانگین شاخص تنوع شانون حدود ۵۱ درصد محاسبه شد، که نشان دهنده تنوع ژنتیکی نسبتا بالای جمعیت قارچ عامل بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا، آفتابگردان و کلم می‌باشد. بر اساس جدول ماتریس شباهت‌های ژنتیکی حاصل از داده‌های مولکولی (جدول ۵)، بیشترین میزان شباهت‌های ژنتیکی مربوط به جدایه‌های شماره ۱۷ (نصرت‌آباد) و ۵ (اسبومحله ۴۲۰ (۱)) بود که حدود ۸۹ درصد محاسبه شد. سپس جدایه‌های ۱۶ (علی‌آباد) و ۲ (کلم)، جدایه‌های ۱۷ (نصرت‌آباد) و ۲ (کلم)، جدایه‌های ۹ (آفتابگردان) و ۲ (کلم) بیشترین میزان شباهت‌های ژنتیکی را دارا بودند که حدود ۸۷ درصد محاسبه شد. جدایه ۱۱ (سرکلاته) با جدایه ۵ (اسبومحله ۴۲۰ (۱)) در ردیف بعدی شباهت ژنتیکی قرار داشتند که حدود ۸۶ درصد محاسبه شد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳- تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به آنها.

آغازگر	تعداد باند تولید شده	تعداد باند چند شکل	درصد چند شکلی	درصد PIC
OPB07	۲۰	۱۸	۹۰	۳۱/۲۷
OPD02	۱۵	۱۵	۱۰۰	۴۲/۶۲
OPC10	۱۶	۱۶	۱۰۰	۳۱/۲۳
OPA02	۲۰	۲۰	۱۰۰	۳۶/۲۲
OPB03	۱۲	۱۲	۱۰۰	۳۳/۰۴
OPC01	۱۷	۱۷	۱۰۰	۳۸/۴۴
OPC04	۱۹	۱۹	۱۰۰	۲۸/۸۵
OPC05	۱۹	۱۹	۱۰۰	۳۳/۸۹
متوسط	۱۷/۲۵	۱۷/۰	۹۸/۵۵	۳۴/۴۴

جدول ۴- تعداد آلل موثر، تنوع ژنی نئی و شاخص تنوع شانون برای هر آغازگر (انحراف معیارها در داخل پرانتز آورده شده است).

آغازگر	تعداد آلل موثر	تنوع ژنی نئی	شاخص تنوع شانون
OPC04	۱/۴۴ (۰/۳۰۷)	۲۷/۷۸ (۰/۱۳۶)	۴۳/۹۲ (۰/۱۶۱)
OPB07	۱/۴۵ (۰/۳۵۰)	۲۷/۱۱ (۰/۱۶۸)	۴۱/۸۵ (۰/۲۲۱)
OPD02	۱/۷۷ (۰/۱۸۶)	۴۲/۶۲ (۰/۰۷۶)	۶۱/۴۷ (۰/۰۸۷)
OPC10	۱/۴۹ (۰/۲۴۹)	۳۱/۲۹ (۰/۱۰۲)	۴۸/۶۱ (۰/۱۱۶)
OPA02	۱/۶۴ (۰/۲۸۴)	۳۶/۹۰ (۰/۱۲۲)	۵۴/۷۷ (۰/۱۴۴)
OPB03	۱/۵۲ (۰/۲۲۰)	۳۳/۰۴ (۰/۰۹۹)	۵۰/۶۷ (۰/۱۱۹)
OPC01	۱/۶۶ (۰/۲۷۷)	۳۷/۸۴ (۰/۱۱۷)	۵۶/۶۰ (۰/۱۳۲)
OPC05	۱/۵۶ (۰/۲۹۹)	۳۳/۳۹ (۰/۱۳۳)	۵۰/۵۹ (۰/۱۵۹)
متوسط	۱/۵۶ (۰/۲۹۶)	۳۳/۴۷ (۰/۱۳۱)	۵۰/۶۱ (۰/۱۶۰)

همچنین میزان شباهت ژنتیکی بین جدایه ۱ (1B مینودشت) با جدایه ۶ (هایولا ۴۰۱ گنبد) حدود ۸۵ درصد و بین جدایه شماره ۳ (هایولا ۴۰۱ چهل‌دین ۲) با جدایه ۷ (هایولا ۴۰۱ کَلاله) و جدایه ۱۱ (سرکلاته ۴۲۰) با جدایه ۲ (کلم) ۸۴ درصد بود و میزان شباهت ژنتیکی بین جدایه ۷ (هایولا ۴۰۱ کَلاله) با جدایه ۲ و همچنین جدایه ۸ (هایولا ۴۰۱ فاضل‌آباد) با جدایه ۵ (اسبومحله ۴۲۰ (۱))، ۸۲ درصد محاسبه شد (جدول ۵).

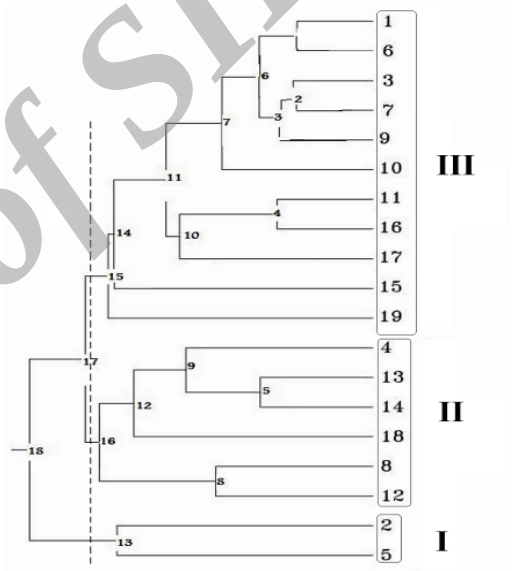
گروه‌بندی جدایه‌ها با تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه نئی با روش UPGMA در شکل۴ نشان داده شده‌است. مطابق درخت-واره به دست آمده و تعیین خط برش بر اساس میانگین فاصله ژنتیکی، ۱۹ جدایه در سه گروه اصلی قرار گرفتند (شکل ۴). گروه یک تنها از دو جدایه ۲ و ۵ تشکیل شده است و گروه دوم شامل شش جدایه (۴، ۸، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۸) بود و ۱۱ جدایه باقی‌مانده در گروه سوم جای گرفتند. از آنجا که جدایه‌های جمع-آوری شده از مناطق مختلف در یک گروه طبقه‌بندی شده‌اند، به نظر می‌رسد ارتباط مشخصی بین مکان جغرافیایی جمع‌آوری جدایه‌ها با این گروه‌بندی وجود ندارد. گروه یک تنها از دو جدایه ۲ و ۵ تشکیل شده است و گروه دوم شامل شش جدایه (۴، ۸، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۸) بود و ۱۱ جدایه باقی‌مانده در گروه سوم جای گرفتند. از آنجا که جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف در یک گروه طبقه‌بندی شده‌اند، به نظر می‌رسد ارتباط مشخصی بین مکان جغرافیایی جمع‌آوری جدایه‌ها با این گروه‌بندی وجود ندارد.

بر اساس تجزیه تعادل هاردی- واینبرگ در جایگاه‌های آللی مختلف، عدد کای‌اسکویر به دست آمده برای هر جایگاه با جدول کای‌اسکویر با درجه‌آزادی ۱۸در سطح احتمال ۵ و یک درصد مقایسه شد و به دلیل کوچک‌تر بودن این عدد (۱۳/۰۲) از عدد

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۵- ماتریس شباهت‌های ژنتیکی جدایه‌های قارچ *S. sclerotiorum* حاصل از داده‌های مولکولی.

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸
۱	****																	
۲	۱/۱۲۷۸	****																
۳	۰/۲۶۱۶	۰/۹۶۴۲	****															
۴	۰/۶۸۶۰	۰/۵۲۷۸	۰/۴۳۴۷	****														
۵	۰/۷۴۴۸	۰/۵۵۲۴	۰/۶۸۶۰	۰/۵۶۵۰	****													
۶	۱۶۳۸۵/۰	۰/۸۷۴۰	۰/۲۷۱۰	۰/۵۴۰۰	۰/۷۲۹۸	****												
۷	۰/۲۹۹۷	۰/۸۲۳۶	۰/۱۷۲۳	۰/۴۱۲۷	۰/۶۵۷۸	۰/۲۳۴۰	****											
۸	۰/۷۱۵۰	۰/۵۵۲۴	۰/۷۷۵۶	۰/۷۲۹۸	۰/۸۲۳۶	۰/۷۲۹۸	۰/۶۸۶۰	****										
۹	۰/۲۱۶۰	۰/۸۷۴۰	۰/۱۹۸۳	۰/۴۹۱۸	۰/۶۱۷۰	۰/۱۸۹۵	۰/۱۹۸۳	۰/۶۱۷۰	****									
۱۰	۰/۳۳۹۴	۰/۷۲۹۸	۰/۴۰۱۹	۰/۶۳۰۴	۰/۶۵۷۸	۰/۲۷۱۰	۰/۴۰۱۹	۰/۴۵۷۱	۰/۲۱۶۰	****								
۱۱	۰/۴۵۷۱	۰/۸۴۰۱	۰/۵۰۳۷	۰/۸۲۳۶	۰/۸۵۶۹	۰/۵۴۰۰	۰/۶۳۰۴	۰/۶۷۱۸	۰/۳۸۰۶	۰/۶۰۳۷	****							
۱۲	۰/۷۷۵۶	۰/۷۴۴۸	۰/۶۳۰۴	۰/۵۴۰۰	۰/۷۲۹۸	۰/۷۶۰۱	۰/۸۰۷۳	۰/۳۳۹۴	۰/۶۱۷۰	۰/۵۰۳۷	۰/۶۴۴۰	****						
۱۳	۰/۶۰۳۷	۰/۶۵۷۸	۰/۳۲۹۳	۰/۳۳۹۴	۰/۴۶۸۶	۰/۵۴۰۰	۰/۳۴۹۵	۰/۸۲۳۶	۰/۴۰۱۹	۰/۶۰۳۷	۰/۶۴۴۰	۰/۵۹۰۷	****					
۱۴	۰/۶۸۶۰	۰/۷۴۴۸	۰/۴۱۲۷	۰/۶۴۴۰	۰/۶۱۷۰	۰/۶۷۱۸	۰/۴۵۷۱	۰/۵۴۰۰	۰/۴۶۸۶	۰/۷۴۴۸	۰/۴۳۵۸	۰/۳۸۰۶	۰/۲۴۳۱	****				
۱۵	۰/۵۵۲۴	۰/۷۷۵۶	۰/۵۰۳۷	۰/۴۶۸۶	۰/۶۴۴۰	۰/۳۸۰۶	۰/۴۸۰۱	۰/۸۲۳۶	۰/۵۴۰۰	۰/۶۳۰۴	۰/۵۱۵۶	۰/۷۹۱۳	۰/۶۷۱۸	۰/۸۵۶۹	****			
۱۶	۰/۳۴۹۵	۰/۸۷۴۰	۰/۳۹۱۲	۰/۷۲۹۸	۰/۷۰۰۴	۰/۴۰۱۹	۰/۴۵۷۱	۰/۶۱۷۰	۰/۲۶۱۶	۰/۴۸۰۱	۰/۲۰۷۱	۰/۵۴۰۰	۰/۵۶۵۰	۰/۴۰۱۹	۰/۶۷۱۸	****		
۱۷	۰/۴۱۲۷	۰/۸۷۴۰	۰/۴۸۰۱	۰/۷۰۰۴	۰/۸۹۱۴	۰/۴۴۵۸	۰/۴۵۷۱	۰/۴۶۸۶	۰/۳۸۰۶	۰/۴۵۷۱	۰/۵۱۵۶	۰/۴۹۱۸	۰/۵۹۰۷	۰/۴۴۵۸	۰/۷۶۰۱	۰/۳۱۹۴	****	
۱۸	۰/۶۳۰۴	۰/۷۷۵۶	۰/۵۹۰۷	۰/۶۴۴۰	۰/۶۴۴۰	۰/۶۴۴۰	۰/۵۱۵۶	۰/۶۳۰۴	۰/۵۰۳۷	۰/۶۷۱۸	۰/۸۹۱۴	۰/۴۲۳۶	۰/۵۱۵۶	۰/۵۶۵۰	۰/۶۴۴۰	۰/۷۲۹۸	۰/۶۷۱۸	****
۱۹	۰/۵۴۵۰	۰/۷۰۰۴	۰/۶۴۸۶	۰/۶۴۵۷۸	۰/۷۱۵۰	۰/۵۲۷۸	۰/۵۱۵۶	۰/۴۳۰۴	۰/۵۰۳۷	۰/۴۹۱۸	۰/۶۵۷۸	۰/۴۳۰۴	۰/۶۴۰۳۷	۰/۷۱۵۰	۰/۶۴۰۳۷	۰/۶۴۸۶۰	۰/۵۷۷۸	۱/۰۲۲۵



شکل۴- درخت‌واره گروه‌بندی ۱۹ جدایه قارچ *S. sclerotiorum* در استان گلستان بر اساس ضریب تشابه نئی با روش UPGMA. شماره‌ها مطابق با شماره ایزوله‌های مندرج در جدول ۲ می‌باشد.

کای‌اسکویر جدول (۲۸/۸۷ برای ۵ درصد و ۳۴/۸۰ برای یک درصد)، نتیجه‌گیری شد که جمعیت مورد مطالعه در تمام جایگاه‌ها در حال تعادل آللی کامل ($P>0/79$) بوده است.

در این تحقیق پرگنه‌های حاصل از نمونه‌های مختلف آلوده به قارچ *S. sclerotiorum* از مناطق مختلف و زراعت‌های مختلف، شکل ظاهری متفاوتی داشتند که از عدم سازگاری (تشکیل مرز مشخص و یا تشکیل مرز شفاف و توده‌های میسلیومی متفاوت) تا سازگاری میسلیومی (همراه با حل شدن میسلیوم‌های بین دو نمونه) متغیر بود. Vakili Zarej and Rahnama (2010) نیز نتایج مشابهی را به دست آوردند. همچنین در تحقیقی که بر روی این قارچ در دره اردن توسط Osofee et al. (2005) انجام گرفت، نتایج مشابهی به دست آمد. از مجموع ۱۷۱ تلاقی انجام شده در این تحقیق، تنها ۲۱ تلاقی (۱۲/۳ درصد) سازگاری میسلیومی نشان دادند که در نتیجه می‌توان تا حدودی سازش ژنتیکی را در بین نمونه‌های به دست آمده از مناطق مختلف پیش‌بینی نمود. با توجه به این موضوع استفاده از بذور وارداتی در صورت عدم نظارت دقیق، می‌تواند نوعی تهدید برای گیاهان زراعی میزبان این بیماری محسوب شود. از طرف دیگر چون در بین این تلاقی‌ها ۱۵۰ تلاقی (۸۷/۷ درصد) ناسازگاری میسلیومی نشان دادند، می‌توان حدس زد این قارچ از لحاظ ژنتیکی دارای تنوع درون‌گونه‌ای بالایی است. این موضوع نحوه مبارزه با آن را توسط قارچ کش‌های رایج مشکل می‌نماید.

نتایج به دست آمده از بررسی مولکولی تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا با استفاده از آغازگرهای RAPD نشان دهنده تنوع نسبتا بالا در جمعیت جدایه‌های جمع‌آوری شده قارچ عامل بیماری، *S. sclerotiorum*، در مناطق مختلف استان گلستان می‌باشد. در بررسی مولکولی دیگر در ایران به طور مشابهی و همزمان با بررسی موجود، با استفاده از آغازگرهای RAPD برروی قارچ *S. sclerotiorum*، از ۳ آغازگر انتخابی شامل Ar0R2، Ar081 و Ar0173 و چند آغازگر (AP-PCR) استفاده شد (Colagar et al. 2010). محصولات PCR برای

Archive of SID
www.SID.ir

۱۲ نمونه منفرد هر کدام چندشکلی زیادی را ایجاد کرد. نمایش باندها با استفاده از نشانگرهای RAPD برای نمونه‌های مختلف قارچ *S. sclerotiorum* با هم تفاوت داشتند. تجزیه کلاستر بر اساس این ۳ آغازگر به وسیله روش UPGMA انجام گرفت و نتیجه‌گیری شد که تکنیک RAPD برای جدا کردن گروه‌های چندگانه مؤثر بوده و تکنیک قابل اطمینانی برای ارزیابی گوناگونی ژنتیکی بین جدایه‌های قارچ بوده است. اما این تفاوت-های ژنتیکی در جدایه‌های قارچ *S. sclerotiorum* هیچ همبستگی مشخصی با وضعیت جغرافیایی جدایه‌ها نداشته است (Colagar et al. 2010). در تحقیق حاضر نیز شباهت‌های ژنتیکی بین جدایه‌ها (جدول۵)، هیچ‌گونه همبستگی با نزدیک یا دور بودن فاصله مکانی نمونه‌های جمع‌آوری شده بیماری نشان نمی‌دهند، زیرا جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف در گروه یکسانی طبقه‌بندی شده‌اند (شکل۴). آنچه مسلم است این تنوع در عامل بیماری اسکلروتینیایی در مناطق مختلف استان پراکنده می‌باشد. در بررسی که توسط Kohen et al. (1979) از بررسی بر روی این قارچ به عمل آمد، اظهار داشتند این نتایج ممکن است ناشی از تنوع بالای ژنتیکی و درصد بالای DNA جهش‌یافته در *S. sclerotiorum* باشد. همچنین بر اساس آنالیز تعادل هاردی- واینبرگ، نشان داده شد که جمعیت مورد مطاله در حال تعادل ژنتیکی است که می‌توان علت آن را در جوان بودن زراعت کلزا در منطقه و وجود میزبان‌های فراوان این قارچ (از جمله علف‌های هرز منطقه) و یا شاید تنوع کم ارقام تحت کشت کلزا در منطقه ذکر نمود. دندروگرام ترسیم شده بر اساس ۸ آغازگر RAPD نشان داد که جدایه ۲ (محمد آباد- گیاه کلم) و جدایه ۵ (اسبو- محله ۴۲۰ (۱))، شباهت بیشتری به هم داشتند و مابقی جدایه‌ها در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند. نتایج به دست آمده از آنالیز RAPD توسط Grenedene and Minardi (2001) در ایتالیا که جهت مطالعه مشخصات ۸ جدایه مایکوپارازیت کونیوتریوم می-نی‌تنس (عامل کنترل بیولوژیک) انجام شده بود، هیچ الگوی باندهی برای برخی آغازگرها مشاهده نشد و آغازگرهای OPA8، OPA9، OPA1، OPA14، OPA17، OPA18 و OPA20 باندهای واضحی تولید نکردند. اما آغازگرهای OPA7، OPA13، OPA15، OPB1، OPB4، OPB6، OPB11، OPB12 و OPB13 با وجود تولید باندهای واضح، نتوانستند چندشکلی بین جدایه‌ها را آشکار سازند. اما، ۸ آغازگر باقی‌مانده (OPA8، OPA9، OPA10، OPA12، OPA16 OPB17، OPB11، OPA11) باندهای چندشکل در بین جدایه‌ها تولید کردند. برخی از آغازگرها (OPA12 و OPB17) تعداد بیش‌تری باند (تا ۱۴ باند) تولید کردند. بعد از ساختن ماتریس با ترکیب اطلاعات به دست آمده از آغازگرهای مورد بررسی، یک دندروگرام ترسیم شد که جدایه-های Z1 و Z2 در یک دسته و ۶ جدایه باقی‌مانده در دسته دیگر قرار گرفتند. مطالعه Arbaoui et al. (2008) بر روی شش جدایه مختلف این قارچ با نشانگرهای ISSR نشان داد که تفاوت‌های ژنتیکی نسبتا بالایی (از ۱۲/۵ تا ۵۴/۸ درصد) بین آنها وجود داشت. همچنین نتایج این مطالعه نشان‌دهنده شباهت بیشتر جدایه‌های جمع‌آوری شده از گیاه لوبیا و آفتابگردان بود و میان منشا جغرافیایی و گروه‌بندی جدایه‌ها ارتباطی مشاهده نشد. مطالعات Carpenter et al. (1999) و Meinhardt et al. (2002) نیز به ترتیب موید تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه جدایه‌های موجود در نیوزیلند و برزیل بود.

با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد قارچ عامل بیماری با وجود جوان بودن زراعت کلزا در استان گلستان از تنوع بالایی برخوردار است که وجود میزبان‌های دیگری از گیاهان زراعی و علف‌های هرز در منطقه احتمالا یکی از دلایل این تنوع ژنتیکی می‌باشد.

منابع

Ahmadikhah A (2008) Principles of plant biotechnology. Gorgan University Press. Gorgan, Iran. (In Farsi)

Bardin SD, Huang HC (2001) Research on biology and control of *Sclerotinia* disease in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology 23: 88-98.

Boland GJ, Hall R (1994) Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Plant Pathology 16: 93-108.

Carpenter MA, Frampton C, Stewart A (1999) Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. New Zealand Jornal of Crop Horticulture Science 27: 13-21.

Archive of SID
www.SID.ir

Chang HH, Kozub GC (1994) Germination of immature and mature *sclerotia* of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology 84: 246-250.
Colagar AH, Saadati M, Zarea MA, Talei SA (2010) Genetic Variation of Iranian *Sclerotiorum* isolates by standardizing DNA polymorphic fragments. Biotechnology 9: 67-72.
Ershad J (1995) The fungi of Iran. Agricultural Research and Education Organization Press. Tehran, Iran. (In Farsi).
Gaten S, Madina M (2005) Occurrence of stem rot on canola caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Argentina. Plant Diseases 89: 530.
Greer GG, Dilts BD (1995) Lactic acid inhibition of the growth of spoilage bacteria and cold tolerant pathogens on pork. International Journal of Food Microbiology 25: 141-51.
Grendene A, Minardi P (2001) Characterization of the mycoparasite *coniothyrum minitans*: Comparison between morpho-physiological and molecular analysis. Mycology 106: 796-807.
Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sale F, Van DE Wiel, C, Bredemejer G, Buiatti M, Maestri E, Malcevshi A, Marmirli N, Aert R, Volckaeret G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A, Karp A (1999) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molecular Breeding 3: 381-390.
Karimi E, Safaie N, Shams-Bakhsh M (2010) Genetic diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from different regions and host plants in Iran. In: Proceedings of 19th Iranian plant protection congress. Iran, 140. (In Farsi)
Kohn LM, Stasovski E, Carbone I, Royer J, Anderson JB (1991) Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology 81: 480-485.
Kohn LM (1979) Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. Phytopathology 69: 881-886.
Kohn LM, Carbone L, Anderson JB (1990) Mycelial in compatibility and molecular markers identify genetic variability in field population of *Sclerotinia sclerotiorum.* Phytopathology 81: 480-485
Kolte SJ (1985) *Sclerotinia* rot. In: Disease of annual edible oilseed crops. Rapseed, Mustard and Sesame diseases. 1-35.
Kull LS, Pederson WL, Palmquist D, Hartan GL (2004) Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *S. sclerotiorum*. Plant Disease 88: 325-322
Lamey HA (1995) Survey of blackleg and *Sclerotinia* stem rot of canola in north Dakota in 1991 and 1993. Plant Disease 79: 322-324.
Letourmeau D (1979) Morphology, Cytology and physiology of *Sclerotinia* species. Phytopathology 69: 887-890.
Malone E, Kopp M, Malone G, Branco JSC, Carvalho FI, Oliviera AC (2009) Genetic distances among rice mutant genotypes assessed by AFLP and aluminum tolerance - related traits. Journal of Crop Science and Biotechnology 10: 106-111.
Meinhardt LW, Wulff NA, Bellato CM, Tsai SM (2002) Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. Fitopatologia Brasileira 27: 211-215.
Arbaoui M, Kraic J, Huszar J (2008) Genetic variation of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from different conditions. Agriculture 54: 36-39.
Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of National Academy of Science of USA 76: 5269-5273.
Noonan MP, Glare TR, Harvey IC, Sands DC (1996) Genetic comparison of *Scleotinia sclerotiorum* isolates from Newsland and USA. In: Proceedings of 49th New Zealand plant protection conference. Nelson, New Zealand. 126-131.
Osofee H, Hameed KM, Mahasneh A (2005) Relatedness among indigenous members of *Sclerotinia sclerotiorum* by mycelial compatibility and RAPD analysis in the Jordan Valley. Plant Pathology Journal 21: 106-110.
Purdy LH (1975) *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Disease and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution and Impact. Phytopathology 69: 875-880.
Rus-Kortekaas V, Smulder MJM, Arens P, Vosman V (1994) Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. Genome 37: 375-381.
Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of National Academy of Science USA 81: 8014-8018.
Tingey SV, Rafalski JA, Williams JGK (1992) Genetic analysis with RAPD markers. In: Applications of RAPD technology to plant breeding: Selected papers from the Joint Plant Breeding Symposia Series. Minneapolis, Minnesota, USA.
Vakili Zarej Z, Rahnam K (2010) Morphological variety and mycelial compatibility grouping in *Sclerotinia scelerotiorum* the causal agent of canola stem white rot in Golestan province. In: Proceedings of 19th Iranian plant protection congress. Iran. 184.
Virk AS, Bran JS, Mangot BK (2000) Cytoplasmic differentiation using near - isonuclear polycytoplasmic male sterile lines in pearl millet. Euphytica 67: 127-134.
Weeden NF, Swiwcicki WK, Timmerman G, Ambrose M (1993) Guidelines for future mapping studies in pisum. Genetics 25: 13-14.
Welsh J, Mc Clelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 19: 303-306.
Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.
Yeh FC, Yang R, Boyle T (1999) POPGENE Version 1.32. Microsoft windows based freeware for population genetic analysis. University of Alberta, Edmonton, AB, Canada. 26.

Archive of SID
www.SID.ir