

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

محمد حاجیان شهری* - جواد زاد- عباس شریفی تهرانی - محمود اخوت- عباس صفرنژاد^۱

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۲/۶

تاریخ پذیرش: ۸۶/۸/۱۹

چکیده

۳۴ جدایه *Uncinula necator* از مویزهای سطح استان خراسان از خرداد ماه تا شهریور ماه سال ۱۳۸۲ جمع آوری شدند. این جدایه‌ها با استفاده از برگ‌های سالم نهالهایی که با بهره‌گیری از روش ریزازدیادی تکثیر شده بودند، تک اسپور شدند. DNA این جدایه‌ها استخراج و تنوع ژنتیکی بین جدایه‌ها با استفاده از تکنیک RAPD-PCR و استفاده از ۲۲ آغازگر ارزیابی شد. برای تولید مواد قارچی لازم در این تحقیق از حداقل ۱۰ برگ انگور استفاده شد و میانگین تولید اندامهای قارچ عامل بیماری در هر جدایه ۱۲ روز پس از مایه زنی بین ۳۸-۶ میلی گرم متغیر بود. آنالیز خوشه‌ای ۱۲۶ بند به دست آمده بر اساس تکنیک RAPD-PCR دو گروه مشخص ژنتیکی را آشکار کرد. گروه اول شامل ۱۱ جدایه جمع آوری شده در مرحله اول (خرداد ماه تا تیرماه) که ۴۷ بند DNA تولید کردند و ۲۴ عدد آنها پلی مورفیک و میانگین عدم شباهت ژنتیکی به دست آمده برای این جدایه‌ها ۲/۸٪ بود. جدایه‌های گروه دوم (مرداد ماه تا شهریور ماه) ۷۹ بند DNA تولید کردند که ۳۳ عدد آنها پلی مورفیک بودند و میانگین عدم شباهت ژنتیکی به دست آمده برای این جدایه‌ها ۶/۸٪ بود. از مجموع ۱۲۶ بند RAPD مشخص که از ۳۴ جدایه مورد آزمایش به دست آمد ۵۷ بند یا ۴۵ درصد بندها پلی مورفیک بودند، در میان ۳۴ جدایه ۲۷ بند با فرکانس ۹۰-۱۰ درصد وجود داشتند و میانگین عدم شباهت ژنتیکی به دست آمده برای ۳۴ جدایه ۰/۷۳۵٪ بود. اطلاعات مولکولی و بیولوژیکی به دست آمده نشان دادند که دسته بندی جدایه‌ها در دو گروه، نماینده دو بیوتیپ مختلف می‌باشند که از نظر ژنتیکی قابل تفکیک می‌باشند.

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

مقدمه

این گیاه است (۱،۱۰). این قارچ در حال حاضر در تمام نواحی موقاری دنیا گسترش دارد اما اعتقاد بر این است که منشأ آن امریکای شمالی می‌باشد (۱۰). این قارچ هتروتال بوده و در بسیاری از نواحی دنیا به شکل کلیستوتسیوم زمستان گذرانی می‌کند (۱۱، ۱۲). از آنجایی که این قارچ پارازیت اجباری است. اطلاعات کمی درباره تنوع ژنتیکی آن، اپیدمیولوژی یا اهمیت تولید مثل جنسی آن وجود دارد.

قارچ عامل بیماری سفیدک سطحی مو *Uncinula necator* (Schwein) Burrill یکی از مهمترین قارچهای بیماری زای

۱. استادیار پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان، استادان، استادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران و استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان

Email: Mhagi52570@yahoo.com

* نویسنده مسئول

بیماری در جهت مدیریت راهبردی این بیماری انجام گرفت.

مواد و روش ها

تولید انبوه جدایه‌های قارچ عامل بیماری

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

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

تهیه جدایه‌های تک اسپور *U. necator*

به منظور تهیه جدایه‌های تک اسپور از *U. necator* براساس روش دلیه و کوریو کاست (۶) عمل شد. برگها یا حبه‌های انگور آلوده به عامل بیماری سفیدک سطحی انگور از نقاط مختلف استان در طول فصل بهار و تابستان سالهای ۱۳۸۱ و ۱۳۸۲ جمع آوری شدند. کلیه نمونه‌های جمع آوری شده بلافاصله در میان برگهای سالم انگور بسته بندی و به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌های جمع آوری شده به مدت ۵-۲ روز روی محیط آب-آگار ۲ درصد در پتری دیشهایی به قطر ۹ سانتی متر نگهداری شدند تا کلنی‌های *U. necator* اسپورزایی کنند. برگهای جوان انگور رقم عسکری که با روش کشت بافت تکثیر شده بودند از گلخانه جمع آوری و برای تهیه جدایه‌های خالص عامل بیماری استفاده شدند. این برگها در ابتدا در زیر هود لامینار به مدت ۵ دقیقه با استفاده از محلول هیپوکلرید سدیم ۱٪ ضد عفونی و سپس با آب مقطر استریل شستشو داده شده و در بین دو برگ کاغذ صافی استریل خشک شدند. برگهای فوق از محل دمبرگ در پتری دیشهای حاوی محیط آب-آگار ۲۰ گرم در لیتر و ۵۰۰ PPM بنزیمیدازول فرو برده شدند. یک تک کنیدی یا زنجیره‌ای از کنیدیها از برگهایی که جدایه‌ها در ابتدا روی آن تکثیر شده بودند با استفاده از یک سوزن تلقیح که به انتهای آن یک قطعه موی دم اسب چسبانده شده بود در زیر یک بینوکولر برداشته شد و در سطح رویی برگهای ضد عفونی شده سالم تلقیح شدند. پس از هربار استفاده این سوزن تلقیح با الکل ۷۰٪ ضد عفونی می‌شد. اطراف پتری دیشهای فوق با استفاده از پارافیلیم مسدود گردید. برگهای تلقیح شده به مدت ۱۴ روز در دمای ۳+۲۲ درجه سانتیگراد و شدت نوری $250 \mu\text{Es}^{-1}$ m^{-2} (میکرومول الکترون در ثانیه بر مترمربع) به مدت ۱۶ ساعت نگهداری شدند.

استخراج DNA براساس روش فنل - کلروفرم

استخراج DNA جدایه‌های جمع آوری شده با استفاده از روش Lee و همکاران (۱۴) و طی مراحل زیر انجام گرفت. ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۵۰ میلی لیتر Tris-HCl، ۵۰ میلی لیتر EDTA و ۳٪ SDS) و ۴ میکرولیتر RNase به ۴۰ میلی گرم میسلوم پودر شده قارچ در لوله‌های ۱/۵ میلی لیتری اضافه گردید. مخلوط به مدت ۱۰ ثانیه با همزن با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه هم زده شد. مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در آب ۶۵ درجه سانتیگراد در حمام آبی گرم گردید. ۷۰۰ میکرولیتر محلول فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) به مخلوط فوق اضافه گردید. مخلوط بدست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و ۳۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی مایع به دست آمده به یک لوله ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل گردید. ۳۰ میکرولیتر استات سدیم (۱ حجم فاز بالایی) و ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵٪ سرد (در فریزر نگهداری شده) به مایع بدست آمده اضافه گردید. مخلوط بدست آمده به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و فاز بالایی دور ریخته شد. در پایان این مرحله مولکول‌های DNA به صورت یک توده سفید رنگ در ته لوله ته نشین می‌شدند. برای خشک کردن توده DNA، درب لوله‌ها را باز نموده و لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه به صورت وارونه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد درون انکوباتور قرار داده شدند. سپس لوله‌ها به حالت اول برگردانده شده و ۱۵ دقیقه در همین حالت نگهداری شدند. در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر و یا بافر TE (۱۰ میلی مول Tris، ۱ میلی مول EDTA) به مولکول‌های DNA درون لوله افزوده شد. بعد از ۵ دقیقه انتظار در شرایط حرارتی آزمایشگاه، لوله‌ها به آرامی با انگشت تکان داده شدند تا مولکول‌های DNA در مایع آزاد شوند. لوله‌های حاوی DNA استخراج شده در فریزر نگهداری شدند. در پایان، وقتی عملیات استخراج

قطعات DNA به شرایط بسیار مناسب برای PCR نیاز داشت قبل از انجام تکنیک RAPD - PCR برای انگشت نگاری DNA جدایه‌های قارچ عامل بیماری، کل سیستم شامل مخلوط PCR، دستگاه ترمال سایکلر و آنزیم پلیمرز با استفاده از شاهد های منفی (جدایه های *Leveillula saxaouli*) و مثبت (جدایه های *U. necator*) سنجیده شده و بهینه گردید.

مشاهده محصول PCR

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

تجزیه و تحلیل داده ها

برای تعیین ارتباط ژنتیکی بین جدایه ها، ابتدا جدایه هایی که بر اساس مشاهده شباهت الگوی DNA تکثیر شده بودند

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

آماده سازی مخلوط PCR

تکنیکر DNA در حجمی معادل ۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR که مقادیر حجمی آنها در ذیل آمده است و بر اساس روش دلپه و همکاران (۳) با اندکی تغییر انجام گردید. مقادیر هر یک از مواد شامل ۰/۴ میکرومول از آغازگرهای ۱۰ نوکلئوتیدی، ۱۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲۰۰ میکرومول از هر یک (dATP، dTTP، dCTP و dGTP)، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase در بافر PCR (۱۰ میلی مول تریس HCl، ۲۵ میلی مول کلرید پتاسیم، ۲ میلی مول کلرید منیزیم و ۱۷ میلی مول سولفات آمونیوم) بود. مخلوط چند بار به آرامی هم زده شد تا مواد و بخصوص آنزیم DNA پلیمرز بخوبی مخلوط شوند. آنگاه سه میکرولیتر از هر نمونه DNA ژنومی (DNA جدایه های مختلف) به کمک میکروپیپتهای ۱۰ میکرولیتری به مخلوط درون هر لوله پلیت PCR اضافه شد.

تنظیم برنامه حرارتی برای واکنش PCR

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

یک چرخه در ۹۴ درجه سانتیگراد دو دقیقه و به دنبال آن ۳۷ چرخه در ۹۴ درجه سانتیگراد یک دقیقه، ۳۷ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد یک دقیقه و برنامه پایانی یک چرخه در ۷۲ درجه سانتیگراد ۵ دقیقه، از آنجائیکه تکثیر

استفاده قرار گرفتند و ۳۴ جدایه عامل بیماری با استفاده از برگهای سالم نهالهایی که با استفاده از روش ریزازدیادی تکثیر شده بودند تک اسپور شدند. برای تولید مواد قارچی لازم به منظور استفاده در روش RAPD-PCR از حداقل ۱۰ برگ مو استفاده شد. عملکرد تولید اندامهای قارچ عامل بیماری ۱۲ روز پس از مایه زنی عامل بیماری بین ۳۸-۶ میلی گرم متغیر بود. جمع آوری اندامهای قارچی از سطح برگها حداکثر در دو مرحله امکان پذیر بود و به علت پیرشدن برگها تولید اندامهای قارچی به شدت کاهش می یافت.

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

گروه بندی و اندازه هریک از بندهای DNA برای تمام جدایه ها مشخص و تمام بندهای قابل ارزیابی تعیین شدند. وجود و یا عدم وجود هریک از بندها بصورت اعداد یک و صفر (یک برای وجود هر بند DNA و صفر برای عدم وجود آن) در یک سیستم دوتایی (Binary System) برای هریک از جدایه ها تعیین و ثبت گردید. جدول ماتریکس دوتایی برای آنها ایجاد گردید. از این ماتریکس برای ایجاد ماتریکس شباهت بین جدایه ها (وقتی همه جدایه ها بصورت دو به دو با هم مقایسه شدند) براساس ضریب دایس (Dice's Coefficient) استفاده شد (۱۶). براساس نتیجه ماتریکس شباهت، تجزیه و تحلیل خوشه ای (Clusteranalysis) به کمک روش UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Average) در نرم افزار کامپیوتری (Statistica) نسخه ۶/۱ انجام شد و فنوگرام مربوطه رسم گردید برای محاسبه استحکام دندروگرام حاصل و تأیید اینکه تا چه حد کلاسترهای ایجاد شده واقعی می باشند، تجزیه و تحلیل Boot strap نیز براساس ماتریکس دوتایی با استفاده از نرم افزار فوق انجام گردید. در این روش تشکیل فنوگرام ۱۰۰ بار تکرار گردید و هر بار نمونه ها بطور خودکار جابجا گردیده و محاسبه شدند و بهترین فنوگرام بدست آمد. به عبارتی بهترین حالتی را که جدایه های مشابه در یک گروه قرار می گرفتند تعیین گردید.

نتایج

نتایج این تحقیق نشان داد که روش ریز ازدیادی تکثیر مو با استفاده از جوانه های انتهایی این گیاه بر روی محیطهای کشت بافت روش بسیار ساده و سریع برای تکثیر این گیاه در آزمایشگاه می باشد. در یک دوره ۳۰ روزه با استفاده از این روش تعداد زیادی نهال مو به دست آمد که برای تکثیر و تک اسپور کردن جدایه های عامل بیماری مورد

دوم (مرداد ماه تا شهریور ماه) ۷۹ بند DNA تولید کردند که ۳۳ عدد آنها پلی مورفیک بودند و میانگین عدم شباهت ژنتیکی به دست آمده برای این جدایه‌ها ۰/۶/۸ بود. از مجموع ۱۲۶ بند RAPD مشخص که از ۳۴ جدایه مورد آزمایش به دست آمد، ۵۷ بند یا ۴۵ درصد بندها پلی مورفیک بودند، در میان ۳۴ جدایه ۲۷ بند با فرکانس ۹۰-۱۰ درصد وجود داشتند و میانگین عدم شباهت ژنتیکی به دست آمده برای ۳۴ جدایه ۰/۰۷۳۵ بود.

شباهت و تجزیه و تحلیل خوشه‌ای (Cluster analysis) به کمک روش UPGMA دو گروه مشخص ژنتیکی (گروه‌های I و II) شناسایی شد. تجزیه و تحلیل Boot strap ۱۰۰ بار تکرار گردید. نتایج نشان داد که این گروه‌ها در صد درصد فنوگرام ایجاد شده وجود دارند. گروه اول شامل ۱۱ جدایه جمع آوری شده در مرحله اول (خرداد ماه تا تیر ماه) بودند که ۴۷ بند DNA تولید کردند که ۲۴ عدد آنها پلی مورفیک و میانگین عدم شباهت ژنتیکی به دست آمده برای این جدایه‌ها ۰/۲/۸ بود. در این گروه، ۱۳٪ این بندها در بین ۱۱ جدایه، بندهای نادر بودند. جدایه‌های گروه

جدول (۱) منشأ جغرافیایی جدایه‌های *U. necator* مورد استفاده در این تحقیق

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

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

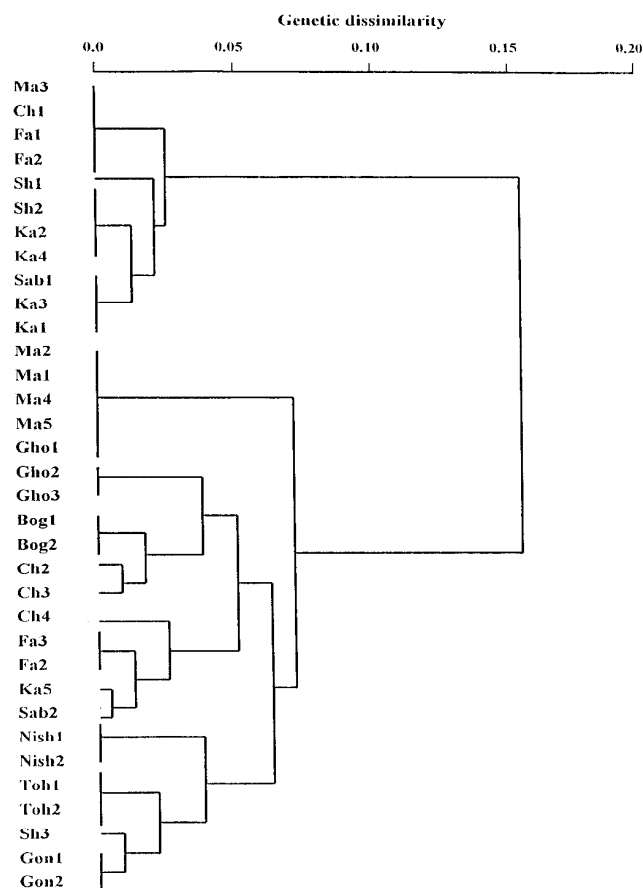
کد آغازگر	توالی	تعداد باندها	مورفیک تعداد بندهای پلی
OPA 9	GGGTAACGCC	9	5
OPA 20	GTTGCGATCC	7	4
OPC 8	TGGACCGGTG	6	2
OPC 10	GACGGATCAG	4	2
OPC 15	GACGGATCAG	5	0
OPE 7	AGATGCAGCC	9	4
OPF 5	CCGAATTCCC	1	1
OPI 14	TGACGGCGGT	3	3
OPJ 1	CCCGGCATAA	9	3
OPJ 18	TGGTCGCAGA	8	4
OPJ 19	GGACACCACT	7	2
OPJ 20	AAGCGGCTC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

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

جدایه‌های جمع آوری شده در خرداد ماه و تیرماه الگوی RAPD خیلی متفاوتی با نمونه‌هایی که در مرداد ماه یا شهریور ماه جمع آوری شده بودند نداشتند. این اطلاعات نشان می‌دهند که در موستانهایی که نمونه‌گیری انجام شده است تغییرات ژنتیکی یا جابه‌جایی ژنتیکی بین جدایه‌ها اتفاق می‌افتد و تقریباً "جمعیت یکسانی از قارچ در موستانها وجود دارد. این جدایه‌ها احتمالاً نماینده بخش زیادی از جمعیت سفیدک سطحی مو در طول فصل هستند. ماتریکس شباهت که از این اطلاعات به دست آمد، نشان داد که سطح تنوع کمی در میان ۳۴ جدایه مورد بررسی وجود دارد (شکل ۱). چهار جدایه بیشترین اختلاف را بر اساس نشانگرهای RAPD (جدایه‌های مشهد ۱، نیشابور ۲، چناران ۱ و قوچان ۲) نشان دادند ضریب دایس شباهت برای این ۴ جدایه ۸۸٪ بود.

بحث

در سالهای اخیر با پیشرفت روشهای مولکولی و امکان مطالعه دقیق میکروارگانیسماها، ابزار لازم برای شناسایی تنوع



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

گروه دوم خیلی متمایز نبودند و علی‌رغم منشأ جغرافیایی گوناگون، تعداد بندهای پلی‌مورفیک خیلی کمی داشتند همچنین آنالیز الگوی باندهای ضریب شباهت از اطلاعات به دست آمده از گروه I و گروه II با گروه‌های فنتیکی A و B که قبلاً توسط استومرو همکاران (۲۰) و دیه و همکاران (۶،۳) در مورد *U. nector* گزارش شده بود مطابقت دارد. نتایج تحقیقات در نقاط مختلف دنیا مؤید این نکته است که زمستان‌گذرانی عامل بیماری سفیدک سطحی مو به صورت آسکوکارپ می‌باشد (۱۲، ۱۰، ۲) در همین رابطه بررسی نحوه زمستان‌گذرانی *U. nectar* در استان خراسان مشخص کرد که زمستان‌گذرانی این قارچ

شده است. (۱۷، ۱۹، ۲۲، ۵). در همین ارتباط حتی مقدار پلی‌مورفیسم کمتری (تقریباً "شبهت ۹۵٪) توسط دیه و همکاران (۳) در بین ۱۳ جدایه *U. nector* نسبت به مطالعه حاضر دیده شده است. در این بررسی ۳۴ جدایه جمع‌آوری شده در دو گروه مشخص دسته‌بندی شدند (شکل ۱) تمامی جدایه‌های جمع‌آوری شده از مرداد ماه تا شهریور ماه در یک گروه و جدایه‌های جمع‌آوری شده در یک باغ در کلادهای یکسان یا در کلادهای مجاور گروه‌بندی شدند. این موضوع با نتایج محققین قبلی موافقت دارد (۳، ۶) و تمامی جدایه‌های جمع‌آوری شده در خرداد و تیرماه نیز در گروه یکسانی قرار گرفتند اما از نظر ژنتیکی از جدایه‌های

شوتها و برگها به طور دائم در حال رشد هستند و سفیدک سطحی مو ممکن است در شوتها یا جوانه‌ها زمستان‌گذرانی کند.

مطالعات نشان داده است که عامل مهم دیگر در تغییر ساختمان جمعیت قارچها ممکن است مهاجرت باشد. اما هیچ گونه همبستگی بین مارکرهای مولکولی و منشاء جغرافیایی جدایه‌ها در این تحقیق به دست نیامد این موضوع نشان می‌دهد که تمامی جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق شباهت ژنتیکی زیادی دارند و فاصله جغرافیایی عاملی در تمایز ژنتیکی جدایه‌ها نیست. هرچند توانایی انتشار گونه‌های قارچی مولد سفیدک سطحی توسط باد مدتها قبل شناخته شده است (۱۳،۲۳) اما هیچ گونه اطلاعاتی در این زمینه در مورد *U. necator* وجود ندارد. به طور کلی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که نشانگرهای مولکولی همانند RAPD می‌توانند شناخت ما را از اکولوژی و ژنتیک جمعیت *U. necator* افزایش دهند و امکان بررسی و مطالعه در زمینه تولید مثل جنسی و رفتار انتشاری این گونه را بدهند. بررسی خویشاوندی ژنتیکی جدایه‌های *U. necator* توسط ضریب شباهت مجموعه جدایه‌های جمع آوری شده در این تحقیق نشان داد که تغییر ژنتیکی در بین و داخل نواحی موکاری استان وجود دارد (شکل ۱). جدایه‌های گروه I تا حد زیادی متغیر بودند و ارتباط بین این جدایه‌ها پیچیده بود. برخلاف نتایج دلیه و همکاران (۴) مطالعه حاضر هیچ گروه بندی روشنی از جدایه‌ها را بر اساس نواحی جغرافیایی که جدایه‌ها از این مناطق جمع آوری شده بودند نشان نداد و تفاوت کمی در بین جدایه‌های گروه II دیده شد. توزیع وسیع جدایه‌هایی با شباهت ژنتیکی زیاد نشان می‌دهد که احتمالاً جریان ژنی (Gene Flow) بین نواحی جغرافیایی اتفاق می‌افتد که ممکن است توسط باد یا جابه جایی مواد گیاهی ناشی از موهای آلوده باشد. هر چند روشهای RFLP و روشهای دیگر مبتنی بر PCR، تنوع

به صورت کلیستوتسیوم می‌باشد و معلوم گردید که رهاسازی آسکوسپورها از مرحله باز شدن جوانه‌ها تا تشکیل گل در مو ادامه دارد و اوج رهاسازی آسکوسپورها بین اسفند تا اردیبهشت ماه اتفاق می‌افتد (۲) بنابراین احتمال دارد تمامی این جدایه‌ها از آسکوسپورهای رهاسازی شده در ابتدای فصل منشاء گرفته باشند و جابه جایی بین جدایه‌های جمعیت گروه اول و دوم در موستانها اتفاق بیافتد که به نظر می‌رسد به علت تفاوت در توانایی بیماری زایی این جدایه‌ها باشد. عدم حضور جدایه‌های نمونه برداری شده در طی خرداد و تیر ماه در مرداد و شهریور ماه نشان می‌دهد که این جدایه‌ها نماینده نسبت پائینی از جمعیت عامل بیماری سفیدک سطحی مو در این زمان می‌باشند یا این گروه رشد و فعالیت زیادی در موستانها ندارند و یا احتمالاً این دو گروه متعلق به تیپهای جفت گیری سازگار (Mating Type) مثبت و منفی هستند و عدم دسترسی به تعداد پائین مارکرهای RAPD تفکیک کننده جدایه‌های گروه اول از گروه دوم می‌تواند دلیلی بر وجود نوترکیبی بالا بین جدایه‌های این گروه‌ها باشد. استومر واسکات (۲۱) وجود نوترکیبی جنسی و تفرق ژنتیکی، بین نتاج حاصل از آسکوسپورهای *U. necator* و تشکیل ژنوتیپهای جدید را اثبات می‌کند و نشان می‌دهند که تولید مثل جنسی می‌تواند بین جدایه‌های مختلف نمایندگان گروههای فتیکی اتفاق بیفتد و منجر به تولید ژنوتیپهای جدید شود. این محققین هم چنین حضور جدایه‌های نماینده هر دو گروه فتیکی را در بین جمعیت‌های *U. necator* در موستانهای استرالیا نشان می‌دهند. همچنین دلیه و همکاران (۴) نشان دادند که جدایه‌های هندی این قارچ در دو گروه ژنتیکی مشخص قرار می‌گیرند، این محققین معتقدند وجود دو گروه مشخص ژنتیکی در هند ممکن است به عوامل محیطی وابسته باشد. در آب و هوای گرم جنوب هند مو به حالت خواب نمی‌رود بنابر این قارچ عامل بیماری نیاز به زمستان‌گذرانی ندارد و

سپاسگزاری

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

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

منابع

۱. بهداد، ا. ۱۳۶۹. بیماریهای درختان میوه ایران. بیماری سفیدک سطحی انگور ۱۷۰ صفحه.
۲. حاجیان شهری. م.، ج. زاد، ع. شریفی تهرانی، م. اخوت و ع. صفر نژاد. ۱۳۸۴. بررسی نقش کلیستوتسیوم در زمستانگذرانی *Uncinula necator* عامل بیماری سفیدک سطحی مو در استان خراسان. مجله عام و فنون کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان. سال نهم شماره اول صفحه ۲۲۵-۲۳۹.
3. Délye, C., Laigret, F., and Corio-Costet, M. F. 1995. A RAPD assay for strainotyping of the biotrophic grape powderymildew fungus *Uncinula necator* using DNA extracted from the mycelium. *Experimental Mycology* 19: 234-23.
4. Délye, C., Laigret, F., and Corio- Costet, M-F. 1997. RAPD analysis provides insight into the biology and epidemiology of *Uncinula necator*. *Phytopathology* 87: 670-677.
5. Délye, C., Laigret, F., and Corio-Costet, M. F. 1997. New tools for studying epidemiology and resistance of grape powdery mildew to DMI fungicides. *Pestic. Sci.* 51: 309-314.
6. Délye, C., and Corio-Costet, M. F. 1998. Origin of primary infections of grape by *Uncinula necator*: RAPD analysis discriminates two biotypes. *Mycol. Res.* 102: 283-288.
7. Evans, K. J., Whisson. D. L., and Scott, E.S. 1996. An experimental system for characterizing isolates of *Uncinula necator*. *Mycol. Res.* 100 (6): 675-680.
8. Evans, K. J. E. S. Scott and Whisson. D. L. 1997. Heterothallism among South Australian clonal lines of *Uncinula necator*. *Australasian Plant Pathology* 26:10-26.
9. Evans, K. J., Whisson, D. L., Stummer, B. E., and Scott, E. S. 1997. DNA markers identify variation in Australian populations of *Uncinula necator*. *Mycol. Res.* 101: 923- 932.
10. Gadoury, D. M., and Pearson, R. C. 1988. Initiation, development, dispersal, and survival of *Uncinula necator* in New York vineyards. *Phytopathology* 78:1413-1421.
11. Gadoury, D. M., and Pearson, R. C. 1990. Ascocarp dehiscence and ascospore discharge in *Uncinula necator*. *Phytopathology* 80: 393-401.
12. Gee, L. M., Stummer, B. E., Gadoury, D. M., Biggins, L. T. and Scott, E. S. 2000. Maturation of cleistothecia of *Uncinula necator* (powdery mildew) and release of ascospores in southern Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6:13-20.
13. Hermansen, J. E., Torp, U., and Prahm, L. P. 1978. Studies of transport of spores of cereal mildew and Rust fungi across. *North Sea. Grana* 17:41-46.
14. Lee, S. B., Milgroom, M. G., and Taylor, J. W. 1988. A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from Fungi. *Fungal Genetic News letter* 35:23-34.
15. Murashighe, T., and Skoog, k. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15:473-497.

16. Nei, M., and Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms or restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5269-5273.
17. Ouellet, T., and Seirert, K. A. 1993. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. Phytopathology 83: 1003-1007.
18. Pearson, R. C., and Gadoury, D. M. 1987. Cleistothecia, the source of primary inoculum for grape powdery mildew in New York. Phytopathology 77: 1509-1514.
19. Sreenivasaprasad, S., Brown, A. E., and Mills, P. R. 1993. Coffee berry disease pathogen in Africa: Genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gleosporioides*. Mycol. Res. 97: 995-1000.
20. Stummer, B. E., Zanker, T., Scott, E. S., and Whisson, D. L. 2000. Genetic diversity in populations of *Uncinula necator*: comparison of RFLP- and PCR- based approaches. Mycol. Res. 104: 44-52.
21. Stummer, B. E., and Scott, E. S. 2003. Detection of novel genotypes in progeny from a controlled cross between isolates of *Uncinula necator* belonging to distinct phenetic groups. Australasian Plant Pathology 32: 213-218.
22. Van Der Vlugt-Bergmans, C. J. B., Brandwagt, B. F., Vant Klooster, J. W., Wagemkers, and Van Kan J. A. I. 1993. Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. Mycol. Res 97: 1193-1200.
23. Yarwood, C. E. 1978. History and taxonomy of powdery Mildews. In: Spencer, D. M. (ed) the powdery Mildews (pp 1-37) Academic Press, London.

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

M.Hajianshahri* - J. Zad - A. Sharifi Tehrani -S. M. Okhovat - AND A. Safarnejad¹

Abstract

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

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

* Corresponding author Email: Mhagi52570@yahoo.com

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