

بررسی تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری آنتراکنوز گردو *Ophiognomonina leptostyla* (Fr.) Sogonov در منطقه ITS و IGS

با استفاده از نشانگر CAPS در شمال غرب ایران

مهدی میانجی^{۱*}، حمید عبداللہی^۲ و سلیمان جمشیدی^۳

چکیده

به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری آنتراکنوز گردو *Ophiognomonina leptostyla* در شمال غرب ایران تعداد ۲۵ جدایه از مناطق مختلف جمع آوری و با استفاده از روش تک اسپورسازی خالص شدند. استخراج DNA از میسلوم قارچ با استفاده از روش لیو و همکاران انجام شد. تکثیر منطقه ITS-rDNA توسط جفت آغازگر اختصاصی، ITS1 و ITS4 انجام گردید. هم چنین منطقه IGS-rDNA با استفاده از جفت آغازگر NS1R و LR13R تکثیر شد. نوارهایی به طول ۶۰۰ جفت باز و ۲۳۲۰-۲۳۰۰ جفت باز از تکثیر منطقه ITS و IGS به دست آمد. قطعات تکثیر شده توسط پنج آنزیم برش دهنده *EcoRI*، *HindIII*، *TagI*، *HinfI* و *BamHI* مورد هضم قرار گرفتند. از مجموع آنزیم های برشی مورد استفاده *EcoRI*، *TagI* و *BamHI* فاقد محل برش بر محصولات تکثیری منطقه ITS و *HinfI* و *BamHI* نیز فاقد محل برش بر محصولات تکثیری منطقه IGS بودند. گروه بندی جدایه های مورد مطالعه بر اساس الگوهای نواری هر دو منطقه در سطح شباهت ۷۵ درصد، آن ها را در چهار گروه طبقه بندی نمود.

واژه های کلیدی: آنتراکنوز، لکه سیاه گردو، PCR-RFLP، *Marssonella juglandis*

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۱

۱. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه * نویسنده مسئول
۲. عضو هیأت علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم و تحقیقات.
۳. عضو هیأت علمی گروه گیاه پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه.

میانجی، م. بررسی تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری آنتراکنوز گردو...

مقدمه و بررسی منابع

گردو یکی از درختان با ارزش از خانواده Juglandaceae است که در بسیاری از نقاط جهان یافت می‌شود. این گیاه متعلق به جنس *Juglans* بوده و تاکنون ۲۱ گونه از این جنس معرفی شده است (Tabatabaei et al., 1998). بیماری آنتراکنوز در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۳۱ توسط خبیری گزارش شد (Behdad, 1979). این بیماری از نقاط مختلف دنیا گزارش گردیده است (Belisario et al., 2008). همچنین این بیماری یکی از بیماری‌های مهم گردو در استان‌های واقع در شمال غرب ایران می‌باشد (Saremi et al., 2006). علائم بیماری در همه قسمت‌های سبز گیاه شامل برگ‌ها، شاخه‌های یک‌ساله، جوانه‌ها، گلبرگ‌ها و پوست میوه ظاهر می‌شود (Belisario et al., 2008). عامل بیماری آنتراکنوز گردو *Ophiognomonium leptostyla* و فرم غیر جنسی آن *Marssoniella juglandis* می‌باشد (Sogonov et al., 2008). زمستان‌گذرانی این قارچ اغلب به صورت پریتسیوم در سطح تحتانی برگ‌ها و گاه میوه‌های ریخته شده در پای درختان صورت می‌گیرد (Belisario et al., 2008). تنوع ژنتیکی نقش مهمی در پایداری و سازش‌پذیری گونه‌ها با محیط زیست اطراف خود بر عهده دارد (Groom et al., 2006). نشانگرهای مولکولی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در سطح DNA، مورد استفاده قرار می‌گیرند (Naghavi et al., 2006). توالی‌هایی از DNA که RNA ریبوزومی را رمز می‌کنند نواحی مناسبی جهت بررسی روابط فیلوژنیک، تاکسونومیک و همچنین قرابت‌های ژنتیکی بین قارچ‌ها به حساب می‌آیند (Burns and Tylor, 1991). در قارچ‌ها ژن‌های ریبوزومی در هسته و در DNA میتوکندریایی قرار گرفته‌اند (White et al., 1990). DNA ریبوزومی هسته‌ای شامل کپی‌های تکراری پشت سر هم از واحدهای رونویسی برای پیش RNA ریبوزومی است. هر واحد رونویسی متشکل از ژن‌های ریبوزومی 18S ویژه زیرواحد کوچک ریبوزوم و ژن‌های ریبوزومی 5.8S و 28S ویژه زیرواحد ریبوزوم قرار می‌گیرند (Luciana et al., 2003). در حدفاصل بین قطعات ژنی 18S، 5.8S و 28S دو قطعه فاصله‌انداز داخلی رونویسی‌شونده^۱ به اسامی ITS1 و ITS2 قرار گرفته‌اند.

همچنین واحدهای رونویسی به وسیله فاصله بین ژنی^۲ به اسم *Luciana et al.* (IGS1-5S-IGS2) از هم جدا شده‌اند (2003).

والورده و همکاران (Valverde et al., 1999) تنوع ژنتیکی ۳۰ جدایه *Ustilago maydis* عامل سیاهک معمولی ذرت را با استفاده از نشانگر RFLP مورد بررسی قرار دادند. نتایج سطح بالایی از تنوع را در بین جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد (Valverde et al., 1999). کونستانتینووا و ماتیلا (Konstantinova and Mattila, 2004) با استفاده از نشانگر CAPS و چهار آنزیم برشی *XhoI*، *PstI*، *MspI*، *AluI* به بررسی تنوع موجود در منطقه IGS-rDNA چهار گونه متعلق به جنس *Fusarium* پرداختند. نتایج الگوی نواری متفاوتی را برای هر یک از گونه‌های مورد مطالعه نشان داد (Konstantinova and Mattila, 2004). بقایای راوری و همکاران (Baghaee Ravari et al., 2007) تنوع احتمالی موجود در منطقه ITS-rDNA با استفاده از نشانگر CAPS، ۲۲ جدایه *Fusarium solani* جمع‌آوری شده از استان‌های شمالی و خراسان رضوی مورد بررسی قرار دادند. تکثیر منطقه با استفاده از جفت آغازگر ITS4/5 و هضم منطقه تکثیری با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *HaeIII* صورت گرفت. نتایج جدایه‌های مورد بررسی را از لحاظ قدرت بیماری‌زایی در گروه تیپ ۱ و ۲ تفکیک کرد (Baghaee Ravari et al., 2007). سانتوس و همکاران (Santos et al., 2007) تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف *Fusarium oxysporum* در مزارع توتون اسپانیا با استفاده از نشانگر CAPS و منطقه IGS-rDNA را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل از تحقیق، جدایه‌ها را در دو گروه با توانایی‌های فیزیولوژیکی برای بیماری‌زایی طبقه‌بندی نمود (Santos et al., 2007). آشنا و همکاران (Ashena et al., 2008) تنوع ژنتیکی منطقه ITS، ۲۰ جدایه *Fusarium solani* جمع‌آوری شده از مزارع چغندر صفی‌آباد دزفول را با استفاده از نشانگر CAPS و آنزیم‌های برشی *BamHI*، *EcoRI*، *MspI* مورد بررسی قرار دادند. تکثیر منطقه ITS با جفت آغازگر ITS1/4 انجام و طول منطقه ۶۰۰ جفت‌باز گزارش شد. نتایج نشان داد که آنزیم *BamHI* فاقد محل برش و آنزیم *EcoRI* دارای الگوی نواری

میسلیوم قارچی به روش لیو و همکاران (Liu et al., 2000) با اندکی تغییرات استخراج و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (Liu et al., 2000). غلظت DNA استخراجی با الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و مقایسه باندها با DNA Ladder (Gene Ruler 1Kb DNA, Fermentas, SM0313 100bp) تخمین زده شد. رنگ آمیزی ژل در محلول اتیدیوم بروماید انجام و تحت نور دارای طول موج ۳۱۲ نانومتر آشکار و با استفاده از دستگاه (Gel document, UV Tak UVdoc, UVitee, Inc., UK) عکس برداری شد. واکنش زنجیره‌ی پلیمرازی^۲ (PCR) مناطق ITS و IGS تمامی جدایه‌ها به ترتیب با استفاده جفت آغازگر اختصاصی ITS1/4 و جفت آغازگر LR13/NS1R انجام شد (جدول ۲). مخلوط واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر برای هر جدایه شامل ۲۵ پیکومول از هر آغازگر، ۳۶ نانوگرم DNA ژنومی، ۰/۴ میلی مول dNTPs (متشکل از غلظت‌های برابر dATP، dTTP، dCTP و dGTP)، ۲ میلی مول MgCl₂، ۲/۵ واحد آنزیم Smart Tag Polymarse و ۵ میکرولیتر بافر 10X PCR تهیه شد. بهینه‌سازی دمای اتصال هر جفت آغازگر، با استفاده از برنامه Gradient PCR، ترمال سایکلر (Thermalcycler Appolo ATC. 410, ver. 4/88, CLP, Inc. USA) انجام شد. بدین منظور با توجه به دمای ذوب^۳ هر جفت آغازگر پنج دمای اتصال^۴ ۴۸، ۴۹، ۵۰، ۵۱ و ۵۲ درجه سلسیوس برای جفت آغازگر ITS1/4 و پنج دمای اتصال^{۳۶}، ۳۷، ۳۸، ۳۹ و ۴۰ درجه سلسیوس برای جفت آغازگر LR13/NS1R انتخاب شد. برنامه حرارتی واکنش PCR برای مناطق ITS و IGS شامل مرحله واسرشته‌سازی مقدماتی، یک چرخه در دمای ۹۴ °C و ۳۵ چرخه برای مراحل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ °C به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال آغازگرها (برای منطقه ITS در دمای ۵۰ °C و اتصال آغازگرها برای منطقه IGS در دمای ۳۸ °C به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه بود. در نهایت یک چرخه در دمای ۸ °C به مدت ۸ دقیقه برای گسترش نهایی تنظیم شد. اندازه قطعات تکثیر شده و اطمینان از صحت انجام واکنش PCR به وسیله ژل آگارز ۱/۲ درصد و مقایسه نوارهای

یکسانی برای تمامی جدایه‌ها بود. آنزیم *MspI* در برخی جدایه‌ها یک محل برش و در برخی دیگر بیش از یک محل برش را نشان داد و جدایه‌ها دارای الگوی نوآردهی متنوعی بودند (Ashena et al., 2008).

صلاحی (Salahi, 2007) به مطالعه منطقه ITS جدایه‌های *Gnomonia leptostyla* جمع‌آوری شده از استان آذربایجان شرقی با استفاده از تکنیک CAPS با استفاده از جفت آغازگر ITS1/4 و ۸ آنزیم برشی پرداخت. از مجموع ۸ آنزیم استفاده شده فقط ۲ آنزیم دارای محل برش بودند و تمامی جدایه‌ها الگوی نوآردهی مشابهی را نشان داده و در یک گروه قرار گرفتند (Salahi, 2007).

با توجه به خسارت بالای بیماری آنتراکتوز گردو در شرایط آب و هوایی اکثر مناطق گردوخیز کشور، امکان گسترش سریع بیماری و وقوع خسارت شدید بسیار محتمل است. از طرفی به دلیل وجود محدودیت‌های فراوان در خصوص کنترل شیمیایی و نیز تحمیل هزینه‌های بالا و ایجاد مشکلات زیست‌محیطی ناشی از مصرف مواد شیمیایی، تهیه و استفاده از ارقام مقاوم مناسب‌ترین و اقتصادی‌ترین راه کنترل بیماری محسوب می‌شود. به منظور تدوین برنامه‌های به‌نژادی، مدیریت بیماری و چگونگی بقای عامل بیماری، شناخت ساختار جمعیت بیمارگر و آگاهی از تنوع احتمالی موجود در منطقه rDNA و بررسی ارتباط آن با بیماری‌زایی و منشأ جغرافیایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که در این راستا تحقیق حاضر به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

در مجموع ۲۵ جدایه *O. leptostyla* از شمال غرب ایران جمع‌آوری و برای تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

کشت خالص تمامی جدایه‌ها روی محیط کشت PDA (Merk Co., Germany, 39g/lit) غنی‌شده با آرد یولاف (پنج گرم در لیتر) انجام و محیط کشت‌ها به دمای ۲۱ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰ درصد و دوره نوری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) برای تشکیل میسلیوم قارچ انتقال داده شدند (Groom et al., 2006). DNA از

2. Polymerase chain reaction (PCR)
3. Melting Temperature (Tm)
4. Annealing Temperature
5. Unweighted pair-group method with arithmetic mean

1. Potato Dextrose Agar

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های مختلف

Table 1. List of collected isolates of *O. Leptostyla* from different provinces of Iran.

نام جدایه Isolate name	محل جمع‌آوری Collection region	استان province	ارتفاع از سطح دریا (متر) Height above sea level (m)	اقلیم منطقه Climate condition
Azr	آذرشهر Azarshahr	آذربایجان شرقی Azarbayejan-e-Sharqi	1390	خشک سرد Cold arid
Osc	اسکو Osco	آذربایجان شرقی Azarbayejan-e-Sharqi	1597	خشک سرد Cold arid
Kss	خسر و شهر Khsroshahr	آذربایجان شرقی Azarbayejan-e-Sharqi	1357	خشک سرد Cold arid
Jol	جلفا Jolfa	آذربایجان شرقی Azarbayejan-e-Sharqi	720	نیمه مرطوب سرد Semi-humid cold
Ajs	عجب‌شیر Ajabshir	آذربایجان شرقی Azarbayejan-e-Sharqi	1357	خشک سرد Cold arid
Mrd	مرند Marand	آذربایجان شرقی Azarbayejan-e-Sharqi	1334	نیمه مرطوب سرد Semi-humid cold
Mdd3	مرند، دیزج Marand, Dizaj	آذربایجان شرقی Azarbayejan-e-Sharqi	1442	نیمه مرطوب سرد Semi-humid cold
Mia	میانه Miyaneh	آذربایجان شرقی Azarbayejan-e-Sharqi	1747	خشک سرد Cold arid
Ngd	نقده Naghade	آذربایجان غربی Azarbayejan-e-Gharbi	1383	خشک سرد Cold arid
Khy1	خوی Khoy	آذربایجان غربی Azarbayejan-e-Gharbi	1136	خشک سرد Cold arid
Khy2	خوی Khoy	آذربایجان غربی Azarbayejan-e-Gharbi	1309	خشک سرد Cold arid
Ard	اردبیل Ardebil	اردبیل Ardebil	1500	نیمه مرطوب سرد Semi-humid cold
Ilm	ایلام Elam	ایلام Elam	1759	نیمه خشک معتدل Medium semi-arid
Krj	کرج Karaj	البرز Alborz	1681	خشک سرد Cold arid
Shr	شهراسر Shahrassar	تهران Tehran	2330	مرطوب معتدل Medium humid
Abs	ابه‌ر Abhar	زنجان Zanjan	1645	نیمه خشک سرد Cold semi-arid
Znj	زنجان Zanjan	زنجان Zanjan	1959	نیمه خشک سرد Cold semi-arid
Qzn	قزوین Ghazvin	قزوین Ghazvin	1423	خشک سرد Cold arid
Zia	ضیاء‌آباد Ziaabad	قزوین Ghazvin	1369	خشک سرد Cold arid
Tak	تاکستان Takestan	قزوین Ghazvin	1323	خشک سرد Cold arid
Mrv	مریوان Marivan	کردستان Kordestan	1320	نیمه مرطوب سرد Cold semi-humid
Krm	کرمانشاه Kermanshah	کرمانشاه Kermanshah	1374	نیمه خشک سرد Cold semi-arid

جدول ۲- نتایج تکثیر منطقه ITS جدایه‌های *O. leptostyla* و هضم آن با آنزیم‌های برشی *HinfI* و *HindIII***Table 2. Amplification results of *O. leptostyla* ITS region and digestion with *HinfI* and *HindIII* restriction enzymes.**

جدایه Isolate	محل جمع آوری Collected location	ITS (bp)	<i>HinfI</i>	<i>HindIII</i>
Azr	آذرشهر Azarshahr	600	335+265	600
Osc	اسکو Osco	600	335+265	600
Kss	خسروشهر Khsroshahr	600	335+265	600
Jol	جلفا Jolfa	600	335+265	600
Ajs	عجب‌شیر Ajabshir	600	335+265	600
Mrd	مرند Marand	600	335+265	600
Mdd3	مرند، دیزج Marand, Dizaj	600	335+265	600
Mia	میانه Miyaneh	600	335+265	300+250+50
Ngd	نقده Naghade	600	335+265	-
Khy1	خوی Khoy	600	335+265	300+250+50
Khy2	خوی Khoy	600	335+265	300+250+50
Ard	اردبیل Ardebil	600	335+265	300+250+50
Ilm	ایلام Elam	600	335+265	-
Krj	کرج Karaj	600	335+265	450+250
Shr	شهراسر Shahrasar	600	335+265	-
Abs	ابهر Abhar	600	335+265	300+250+50
Znj	زنجان Zanjan	600	335+265	300+250+50
Qzn	قزوین Ghazvin	600	335+265	450+250
Zia	ضیاء‌آباد Ziaabad	600	335+265	-
Tak	تاکستان Takestan	600	335+265	450+250
Mrv	مریان Marivan	600	335+265	-
Krm	کرمانشاه Kermanshah	600	335+265	-

از مجموع ۵ آنزیم برشی استفاده شده برای هضم منطقه ITS، فقط دو آنزیم *HinfI* و *HindIII* دارای محل تشخیص و برش در منطقه تکثیر شده بودند. محصول هضم آنزیم *HinfI* دو قطعه به بزرگی ۲۶۵ و ۳۳۵ جفت باز بود. تقریباً تمامی جدایه‌ها الگوی نواری یکسانی را نشان دادند و دارای مکان برش مشابهی بودند. صلاحی (Salahi, 2007) نیز الگوی نواری مشابهی را بر اثر هضم محصولات PCR منطقه ITS توسط این آنزیم برای جدایه‌های آذربایجان شرقی به دست آورد. آنزیم *HindIII* دارای مکان‌های تشخیص و برش نسبتاً متفاوتی در محصول PCR منطقه ITS برخی از جدایه‌ها بود. جدایه‌های *Azr*, *Osc*, *Kss*, *Ajs*, *Mrd*, *Mdd3* و *Jol* فاقد مکان تشخیص و برش توسط این آنزیم بوده و قطعه تقریباً ۶۰۰ جفت‌بازی را نشان دادند. جدایه‌های *Krj*, *Qzn* و *Tak* دارای یک مکان تشخیص و برش و دو قطعه به اندازه‌ی تقریبی ۲۵۰ و ۴۵۰ جفت‌باز بودند. جدایه‌های *Ard*, *Khy1*, *Khy2*, *Mia* و *Abs* دارای دو مکان تشخیص و برش توسط آنزیم فوق بوده و نتیجه هضم سه قطعه به اندازه تقریبی ۵۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ جفت‌باز بود. تفاوت در مکان برش آنزیم *HindIII* احتمالاً به دلیل وجود موتاسیون‌های نقطه‌ای در این منطقه بوده است. جدول ۲ نتایج تکثیر منطقه ITS جدایه‌های *O. leptostyla* و هضم آن توسط آنزیم‌های برشی *HinfI* و *HindIII* را نشان می‌دهد.

تکثیر و هضم آنزیمی منطقه IGS

نتیجه واکنش PCR منطقه IGS در قارچ *O. leptostyla* توسط جفت آغازگر CNL12/NS1R در حدود ۲۳۲۰-۲۳۰۰ جفت‌باز تخمین زده شد. تاکنون گزارشی در مورد اندازه منطقه IGS در این قارچ نشده است. کونستانتیوا و ماتیلایا (Konstantinova and Mattila, 2004) طول منطقه IGS را در گونه‌های مختلف جنس *Fusarium* بین ۲۲۰۰ تا ۲۴۰۰ جفت‌باز تعیین نمودند (Konstantinova and Mattila, 2004). به نظر می‌رسد به دلیل خارج ژنی بودن منطقه IGS در rDNA بروز جهش نقطه‌ای، حذف و اضافه شدن در این منطقه ممکن بوده و در نتیجه طول این منطقه تکثیری احتمال دارد در جنس‌های مختلف و گونه‌های قارچی مربوط به آن‌ها دستخوش تغییراتی شود.

محصولات PCR با مارکر DNA صورت گرفت. تفاوت در محل برش توالی‌های مناطق تکثیر یافته توسط آنزیم‌های برشی *EcoRI*, *TagI*, *HindIII*, *HinfI* و *BamHI* آشکار شد. برای هضم و برش محصولات PCR طبق دستورالعمل شرکت سازنده و به ازای ۱۰ میکرولیتر محصول واکنش PCR، ۱۸ میکرولیتر آب دو بار تقطیر شده و استریل، ۲ میکرولیتر آنزیم و ۲ میکرولیتر بافر مخصوص هر آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. توقف هضم محصولات PCR توسط آنزیم‌های برشی، پس از حدود ۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ °C با اضافه نمودن ۰/۵ مول EDTA انجام شد. به منظور آنالیز نتایج به دست آمده، وجود یا عدم وجود نوار به صورت یک و صفر امتیازدهی و وارد نرم‌افزار Excel گردید. ماتریس تشابه همه جدایه‌های مورد مطالعه بر اساس ضریب تشابه جاکارد برای داده‌های به دست آمده محاسبه و برای رسم دندروگرام روش UPGMA بسته نرم‌افزاری NTSYSStc 2.02e مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

بهینه‌سازی دمای اتصال آغازگرها

با توجه به کیفیت برتر DNA استخراجی جدایه عجب‌شیر، از این جدایه برای بهینه‌سازی دمای اتصال آغازگرها استفاده شد. پس از انجام واکنش PCR، بهترین دمای اتصال برای جفت آغازگر ITS1/4 منطقه ITS، ۵۰ درجه سلسیوس و بهترین دمای اتصال برای جفت آغازگر LR13R/NS1R منطقه IGS، ۳۸ درجه سلسیوس به دست آمد.

تکثیر و هضم آنزیمی منطقه ITS

منطقه ITS تمامی جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ITS1/4 و واکنش PCR تکثیر شد. اندازه قطعه تکثیر شده در تمامی جدایه‌ها ۶۰۰ جفت باز بود. صلاحی (Salahi, 2007) طول این منطقه را در جدایه‌های *O. leptostyla* منطقه آذربایجان شرقی نیز ۶۰۰ جفت باز گزارش نمود (Salahi, 2007). بقایای راروی و همکاران (Baghaee-Ravari et al., 2007) طول منطقه ITS را در قارچ *F. solni* در محدوده ۶۰۰ جفت باز تشخیص دادند. مقایسه منطقه تکثیر شده توسط جفت آغازگر ITS1/4 با مناطق ITS سایر جنس‌های قارچی، بیانگر حفاظت‌شدگی شدید طول منطقه به لحاظ واقع شدن درون ژن rDNA است.

و استان آذربایجان غربی بودند. در گروه دوم دو شاخه وجود داشت که اختلاف جزئی با هم داشتند. در یک شاخه جدایه‌های مربوط به مناطق میانه و خوی و در شاخه دوم جدایه‌های مناطق اردبیل، ابهر و زنجان قرار گرفتند. این جدایه‌ها مربوط به شهرهای قسمت شرقی استان آذربایجان شرقی، استان اردبیل و زنجان بودند. در گروه سوم جدایه‌های کرج، قزوین و تاکستان قرار داشتند که از استان‌های تهران و قزوین جمع‌آوری شده بودند. گروه چهارم متشکل از جدایه‌های مناطق نرده، ایلام، شهراسر، ضیاءآباد، مریوان و کرمانشاه بود. این جدایه‌ها در مناطق واقع در جنوب استان آذربایجان غربی و استان‌های غرب کشور قرار دارند. شکل ۲ نقشه پراکنش جغرافیایی جدایه‌ها و گروه‌بندی آن‌ها را با توجه به دندروگرام فوق نشان می‌دهد.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و تحقیقات انجام یافته توسط سایر محققان می‌توان نتیجه گرفت که نشانگر CAPS می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر کاربردی در ارزیابی تنوع ژنتیکی قارچ‌ها خصوصاً در ناحیه rDNA استفاده شود. ارزیابی تنوع جدایه‌های مختلف *O. leptostyla* بیانگر وجود تنوع بسیار جزئی در منطقه شمال غرب کشور است. تنوع موجود در منطقه IGS هم بر اثر تفاوت در توالی نوکلئوتیدی و هم در طول توالی بوجود آمده است. درحالی‌که تنوع موجود در ناحیه ITS فقط بر اثر تفاوت در توالی نوکلئوتیدی ایجاد گردیده است. با توجه به این‌که کانون اصلی انتشار بیماری آنتراکنوز گردو در کشور، استان‌های شمال غربی می‌باشد، تحقیق حاضر موید وجود حداقل چهار گروه جدایه در این منطقه از کشور است. لذا به نظر می‌رسد که ارزیابی دقیق‌تر از طریق توالی‌یابی مناطق IGS و ITS ضروری است. هم‌چنین پیشنهاد می‌گردد در برنامه‌های به‌نژادی گیاهان اثر متقابل جدایه یا شدت بروز بیماری روی ارقام گردو مورد بررسی قرار گیرد.

از مجموع ۵ آنزیم برشی مورد استفاده برای هضم منطقه IGS سه آنزیم *EcoRI*، *TagI* و *HindIII* دارای مکان تشخیص و برش در محصول PCR این منطقه بودند. آنزیم *EcoRI* در تمامی جدایه‌های مورد مطالعه دارای دو مکان تشخیص و برش و محصول هضم سه قطعه به اندازه تقریبی ۱۴۰۰، ۵۰۰ و ۴۰۰ جفت‌باز بود. همگی جدایه‌ها الگوی نواری یکسانی را نشان دادند. آنزیم *TagI* نیز بر محصولات تکثیری منطقه IGS دارای دو مکان تشخیص و برش و محصول هضم سه قطعه به اندازه تقریبی ۱۲۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۰۰ جفت‌باز بود. همگی جدایه‌ها الگوی نواری مشابهی را بر اثر هضم توسط این آنزیم نشان دادند. آنزیم *HindIII* بر محصولات تکثیری منطقه IGS دارای سه مکان تشخیص و برش بود. نتیجه برش تولید چهار قطعه به اندازه‌های ۹۵۰، ۸۰۰، ۴۰۰ و ۱۵۰ جفت‌باز بود. ولی چهار جدایه *Mia*، *Ngd*، *Khy1* و *Abs* دارای قطعه تقریباً ۹۷۰ جفت‌بازی بودند. به‌نظر می‌رسد این چهار جدایه دارای منطقه IGS نسبتاً طولانی‌تری هستند. تاکنون گزارشی در مورد کاربرد آنزیم‌های برشی بر منطقه IGS قارچ *O. leptostyla* نشده است. نتایج تحقیقات کونستانتیوا و ماتیل (Konstantinova and Mattila, 2004) با استفاده از آنزیم‌های برشی *AluI*، *PstI*، *MspI* و *XhoI* برای هضم منطقه IGS گونه‌های مختلف *Fusarium* نشان داد که این آنزیم در گونه‌های مختلف دارای نقاط برش متفاوتی است (Konstantinova and Mattila, 2004). جدول ۳ نتایج تکثیر منطقه IGS جدایه‌های *O. leptostyla* و هضم آن را با آنزیم‌های برشی *EcoRI*، *TagI* و *HindIII* را نشان می‌دهد.

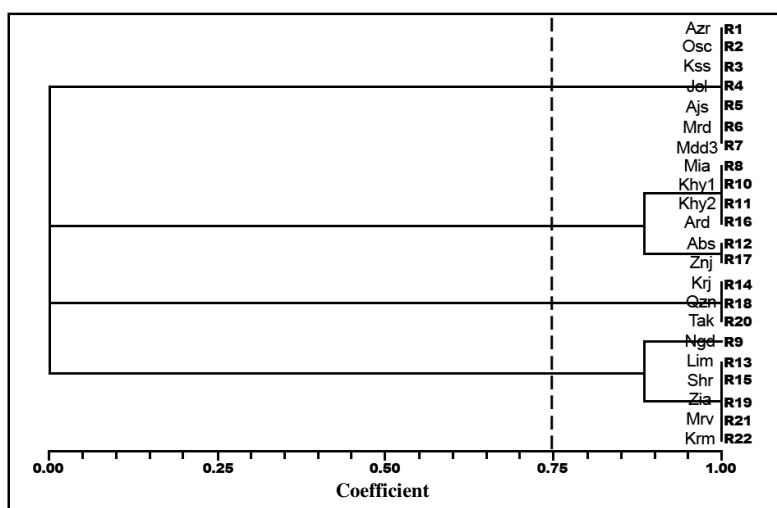
گروه‌بندی جدایه‌ها

دندروگرام UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد برای داده‌های منطقه ITS و IGS در سطح شباهت ۷۵ درصد، جدایه‌های مورد مطالعه را در چهار گروه طبقه‌بندی نمود (شکل ۱). گروه اول شامل جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق آذرشهر، اسکو، خسروشهر، جلفا، عجب‌شیر و مرند بود. این مناطق مربوط به شهرهای واقع در غرب استان آذربایجان شرقی

جدول ۳- نتایج تکثیر منطقه IGS جدایه‌های *O. leptostyla* و هضم آن با آنزیم‌های برشی *EcoRI*، *TagI* و *HindIII*

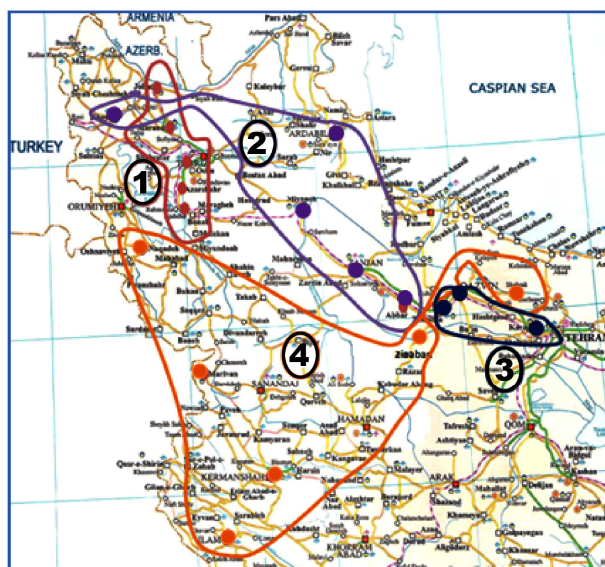
Table 3. Amplification results of *O. leptostyla* IGS region and digestion with *EcoRI*, *TagI* and *HindIII* restriction enzymes.

جدایه Isolate	محل جمع‌آوری Collected location	IGS (bp)	<i>EcoRI</i>	<i>TagI</i>	<i>HindIII</i>
Azr	آذرشهر Azarshahr	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Osc	اسکو Osco	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Kss	خسروشهر Khsroshahr	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Jol	جلفا Jolfa	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Ajs	عجب‌شیر Ajabshir	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Mrd	مرند Marand	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Mdd3	مرند، دیزج Marand, Dizaj	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Mia	میانه Miyaneh	2320	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+970
Ngd	نقده Naghade	2320	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+970
Khy1	خوی Khoy	2320	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+970
Khy2	خوی Khoy	2320	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+970
Ard	اردبیل Ardebil	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+970
Ilm	ایلام Elam	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Krj	کرج Karaj	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Shr	شهراسر Shahrasar	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Abs	ابهر Abhar	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Znj	زنجان Zanjan	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Qzn	قزوین Ghazvin	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Zia	ضیاءآباد Ziaabad	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Tak	تاکستان Takestan	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Mrv	مریوان Marivan	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950
Krm	کرمانشاه Kermanshah	2300	400+500+1400	100+1000+1200	150+400+800+950



شکل ۱- دندروگرام داده‌های حاصل از الگوریتم UPGMA مناطق ITS و IGS با استفاده از ضریب تشابه در جاکار، جدایه‌های *O. leptostyla*

Fig. 1. Dendrogram based on ITS and IGS regions UPGMA data analysis of *O. leptostyla* isolates with Jacard similarity coefficient



شکل ۲- نقشه پراکنش جدایه‌های *O. leptostyla* بر اساس گروه‌بندی حاصل از آنزیم‌های برشی منطقه IGS و ITS در شمال‌غرب کشور

Fig. 2. Distribution map of *O. leptostyla* isolates based on ITS and IGS restriction enzymes grouping in northwest of Iran

منابع

- Ashena S, Zamanizade HR, Mahmodi SB (2008) Pathogenic variability and genetic diversity of *Fusarium solani* isolates and its association with sugarbeet root rot. Sugar Beet Journal 24(1): 77-95. [In Persian with English Abstract].
- Baghaee Ravari S, Falahati Rastegar M, Jafarpour B, Shokoohifar F (2007) The study of probable variation in ITS-DNA region of *Fusarium solani* in potato and its correlation with pathogenicity and geographical origin in Razavi and Northern Khorasan provenance. Journal of Agricultural Science and Natural Resources, 14(3): 32-41. [In Persian with English Abstract].
- Behdad E (1979) Disease of fruits crops in Iran. Neshat publication, Inc, second edition. Esfahan. [In Persian with English Abstract].

- Belisario A (2002) Anthracnose. pp. 77-78. In: Teviotdale BL, Michailides TJ and Pscheidt JW (eds.), Compendium of nut crop diseases in temperate zones. USA: APS Press.
- Belisario A, Scotton M, Santori A, Onofri S (2008) Variability in the Italian population of *Gnomonia leptostyla*, homothallism and resistance of *Juglans* species to anthracnose. Forest Pathology 38: 129-145.
- Burns TD, White TJ, Tylor JW (1991) Fungal molecular systematics. Annual Review of Ecological System 22: 525-564
- Cesati V, De Notaris G. (1863). Schema di classificazione degle sferiacei italici aschigeri piu' o meno appartenenti al genere Sphaeria nell'antico significato attribuitoglide Persono. Commentario della Società Crittogamologica Italiana 1(4): 205.
- Groom MJ, Meffe GK, Carroll CR (2006) Principles of conservation biology (3rd ed). Sunderland, MA: Sinauer Associates. <http://www.sinauer.com/groom>.
- Konstantinova P, Yli-Mattila T (2004) IGS-RFLP analysis and development of molecular markers for identification of *Fusarium poae*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium kyushuense*. International Journal of Food Microbiology 95: 321-331.
- Liu D, Sue C, Baird R, Pedersen J (2000) Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. Journal of Clinical Microbiology 38 (1): 471-471.
- Luciana B, Lourenço L, Paulo C, Garcia A, Shirlei M, Pimentel R (2003) Restriction fragment analysis of the ribosomal DNA of *Paratelmatoobius* and *Scythrophrys* species (Anura, Leptodactylidae). Genetics and Molecular Biology 26 (2): 139-143.
- Naghavi MR, Ghariiazzi B, Hosseini Salekdeh G (2006) Molecular markers. Tehran University, Tehran. ISBN 964-03-5107-5. [In Persian with English Abstract].
- Salahi, S (2007) Study of genetic diversity in *Gnomonia leptostyla* casual agent of walnut anthracnose by PCR and evaluation of its distribution and survival in east azarbaijan, Iran. M.Sc. Thesis, University of Tehran, Tehran, Iran. [In Persian with English Abstract].
- Santos SM, Martinez-Bermejo D, Rodri guez-Molina MC, Diez JJ (2007) Cultural characteristics, pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from tobacco fields in Spain. Physiological and Molecular Plant Pathology 71: 26 - 32.
- Saremi H, Hashemi SR, Okhovvat SM (2006) Severity of walnut anthracnose and its relatively resistant in Iran. Communication in Agricultural and Applied Biological Science 71: 1267-74. [In Persian with English Abstract].
- Sogonov MV, Castlebury LA, Rossman AY, Mejia LC, White JF (2008) Leaf-inhabiting genera of the Gnomoniaceae, Diaporthales. Mycology 62: 1-77.
- Tabatabaei M, Dehlavi A, Ahmadi AR (1998) Walnut, hicory and pecan. Jihad-e-Daneshgahi press. Tehran. [In Persian with English Abstract].
- Val Verde M, Vandemark G, Martinez O, Paredes- Lope Z (1999) Genetic diversity of *Ustilago maydis* strains. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16: 49-55.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: Innis, M A. Gelfand, D H Sninsky, J J, White T J.(eds), PCR protocols: a guide to methods and applications. MA Innis Academic Press, San Diego. CA. USA.