

بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌های مرتبط با بیماری *Esca* انگور با استفاده از تکنیک RAPD-PCR در باغات انگور استان خراسان شمالی

محمد بهرآبادی^۱ - محمود رضا کریمی شهری^{۲*} - مجید هاشمی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۲۵

چکیده

یکی از مهم‌ترین و مهلك‌ترین بیماری‌های قارچی مو، بیماری اسکا می‌باشد. بیماری اسکا تحت عنوان زوال مو (سکته مو) نیز نامیده می‌شود و معمولاً انگورهای با بیش از ۱۰ سال سن را آلوده می‌نماید. نمونه برداری در طی سال‌های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ از تاکستان‌های شهرستان‌های بجنورد و فاروج (خراسان شمالی) صورت گرفت و قارچ‌های *Phaeoacremonium aleophilum*، *Phaeoacremonium parasiticum* و *Phaeomoniella chlamydospora* و *Fomitiporia mediterranea* جداسازی گردیدند. جدایه‌هایی که بیشترین تنوع را در خصوصیات ریخت‌شناسی داشتند انتخاب شده و چند شکلی DNA جدایه‌ها با استفاده از ۱۰ آغازگر تصادفی RAPD-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیز RAPD در این تحقیق نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل توجهی در بین گونه *Fomitiporia mediterranea* وجود دارد و تقریباً یکنواختی ژنتیکی در بین گونه *Phaeomoniella chlamydospora* مشاهده شد. همچنین به منظور مطالعه تفکیک بین سه جنس *Phaeoacremonium*، *Phaeomoniella* و *Fomitiporia* از میان ده آغازگر مورد استفاده، پنج آغازگر تصادفی انتخاب شدند. بر اساس نتایج آنالیز کلاستر جدایه‌ها به چهار گروه ژنوتیپی تفکیک شدند. با توجه به نتایج این آزمایش می‌توان بیان کرد که نشانگر RAPD-PCR پتانسیل نسبتاً بالایی در تعیین تنوع ژنتیکی قارچ‌های مولد اسکای مو دارد. این اولین گزارش از تنوع ژنتیکی عوامل مولد اسکای مو در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: انگور، اسکا، تنوع ژنتیکی، RAPD-PCR

مقدمه

چوب می‌باشد که به وسیله یک خط سیاه یا قهوه‌ای تیره احاطه شده و همچنین شامل لکه قهوه‌ای تیره تا سیاه می‌باشد (شکل ۲). بیماری اسکا در اواسط تابستان باعث پژمردگی سریع و مرگ ناگهانی (Apoplexy) انگورها می‌شود (۱۳). ابتلا به بیماری اسکا بیشتر بر روی انگورهای مسن متداول است هر چند گزارش‌هایی از وجود این بیماری بر روی انگورهای جوان نیز دیده شده است (۵). قارچ‌های متعددی در ارتباط با علائم اسکا گزارش شده است از جمله بازیدیومیست‌های *Fomitiporia mediterranea* و تا اندازه‌ای کمتر *Stereum hirsutum* و همچنین *Trametes hirsuta* که باعث پوسیدگی سفید چوب می‌شوند همچنین قارچ‌های ناقص *Phaeomoniella chlamydospora* و چندین گونه از قارچ *Phaeoacremonium (Pm.)* که باعث ایجاد لکه‌های قهوه‌ای تیره تا سیاه در بافت چوب می‌شوند (۲، ۸).

یکی از مهم‌ترین و مهلك‌ترین بیماری‌های قارچی مو، بیماری اسکا می‌باشد. این بیماری با بیش از ۱۰۰ سال سابقه در باغات انگور وجود داشته و تقریباً هر جایی در دنیا که انگور کشت و کار می‌شود، این بیماری گزارش شده است (۴). برگ‌های مبتلا به اسکا دارای لکه‌های سبز روشن یا کلروتیک در بین رگبرگ‌ها می‌باشند که به تدریج نکروتیک شده و برگ‌های بیمار الگوی پوست ببری پیدا می‌کنند (شکل ۱). علائم داخلی شامل ناحیه‌ای از پوسیدگی سفید

۱- کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

۲- استادیار بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد

*- نویسنده مسئول: (Email: karimi_in@yahoo.com)

۳- استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج



شکل ۲- برش عرضی از چوب انگور دارای پوسیدگی سفید



شکل ۱- علائم برگ‌های انگور مبتلا به اسکا

ایجاد کننده سکنه مو و تنوع ژنتیکی و همچنین اصلاح روش‌های تشخیصی قارچ‌های مولد بیماری اسکا، مفید باشند (۱۸، ۲۰).
پلاسترو و همکاران (۱۸) گزارش کردند که بر اساس واکنش RAPD-PCR و با استفاده از ۲۰ آغازگر تصادفی تمامی ایزوله‌های جمع‌آوری شده قارچ *Fomitiporia* در یک گروه قرار گرفته و متعلق به گونه *F. punctata* می‌باشند. همچنین آنها نتیجه گرفتند که این قارچ از قلمه‌های آلوده به قلمه‌های سالم سرایت نمی‌کند بلکه آلودگی از طریق بازیدیوسپور ایجاد می‌شود.
F. punctata اولین بازیدیومیست مربوط به اسکا می‌باشد که با استفاده از داده‌های اپیدمیولوژی و مولکولی مورد مطالعه قرار گرفته است (۹، ۴). *Fomitiporia mediterranea* نیز یک بازیدیومیست همراه با اسکا است که پراکنندگی جغرافیایی غیر یکنواخت داشته و ناحیه‌ی آب و هوایی متفاوت را در بر می‌گیرد. میزبان‌های این گونه شامل افرا، کیوی، زغال اخته، فندق، زیتون، بلوط، آقاچیا و انگور و... می‌باشند (۱۱).

تنوع ژنتیکی جمعیت در بین گونه‌های مختلف قارچ‌های مرتبط با بیماری سکنه مو می‌تواند نشان دهنده میزان تغییرات ژنتیکی در نمونه‌های مختلف جمع‌آوری شده باشد. شناسایی و تفکیک مورفومتریک گونه‌های *Phaeoacremonium* و جنس *Phaeomoniella* کمی دشوار بوده و در برخی موارد همراه کننده می‌باشد، لذا جهت تفکیک بهتر گونه‌ها و شناسایی آن‌ها روش RAPD پیشنهاد می‌گردد (۱۸).

ایساختی و همکاران (۶) توانستند بر اساس آنالیز فیلوژنی توالی DNA ژن‌های بتا-توبولین، اکتین و کالمودولین ۴ گونه جدید *Phaeoacremonium* به نام‌های *Pm. croatiense*، *Pm.*

گونه‌های *Phaeoacremonium* در مناطق مختلف جهان مانند استرالیا، اتریش، فرانسه، یونان، ایران، ایتالیا، پرتغال، آفریقای جنوبی، اسپانیا، ایالات متحده آمریکا و ترکیه از انگور جدا شده‌اند. دامنه‌ی میزبانی *Phaeoacremonium* شامل اغلب گیاهان چوبی، لارو سوسک‌های پوست خوار و انسان می‌باشد (۱۲).

این بیماری اولین بار در ایران توسط کریمی و همکاران گزارش شد (۱۰). سپس محمدی و بنی‌هاشمی از فارس این بیماری را گزارش کردند (۱). بیماری اسکا می‌تواند باعث زیان‌های مهم اقتصادی ناشی از دوباره کاری و کاهش محصول در تاکستان‌ها شود (۹).

دامنه میزبانی وسیع این قارچ‌ها و پراکنش آن‌ها در شرایط آب و هوایی مختلف و سازگاری آن‌ها باعث شده است که منابع اینوکولوم به طرق مختلف و به فراوانی و در شرایط مساعد، بیماری را افزایش دهند. حضور این بیماری در قلمه‌ها و پایه‌های تهیه شده در خزانه‌ها نشان می‌دهد که خزانه نیز از این بیماری در امان نبوده و مدیریت خزانه و هزینه‌های آن تحت تاثیر این بیماری قرار می‌گیرند. برخی گونه‌های قارچی جدا شده در بیماری اسکا سبب بیماری‌های دیگری در انگورهای جوان می‌شوند که مهم‌ترین آن‌ها بیماری پتری یا زوال انگورهای جوان می‌باشد که علائم آن با بیماری اسکا متفاوت می‌باشد و تاکستان‌های تازه احداث شده با خطر این بیماری روبرو می‌باشند. بیماری پتری باعث جلوگیری از رشد و مرگ انگورهای جوان ۴-۵ ساله می‌گردد (۱۳).

نشانه‌های مولکولی می‌توانند در جهت بررسی جنبه‌های مختلفی از بیماری اسکا مو که هنوز ناشناخته باقی مانده، از جمله اپیدمیولوژی بیماری، اپیدمیولوژی بیماری و جنبه‌های تاکسونومی عوامل

جدایه های مورد بررسی در جدول ۱ آمده است. نمونه‌های بیمار به آزمایشگاه منتقل شدند و برای جداسازی عامل بیماری آماده کشت شدند. تنه های بزرگ را که دچار پوسیدگی سفید درونی بودند، کاملاً از وسط شکافته و از قسمت مرکزی تنه نمونه هایی به ابعاد کوچک تهیه شد. از قسمت مرکزی تنه به طرف قسمت بیرونی علائم دیگری از بیماری به شکل پوسیدگی قهوه ای خود نمایی می کند، از این قسمت نیز نمونه های کوچکی تهیه شد. این نمونه ها پس از ضدعفونی سطحی توسط هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۵-۴ دقیقه و شستشو توسط آب مقطر استریل، روی کاغذ صافی استریل منتقل تا کاملاً خشک شوند. نمونه های خشک شده بر روی محیط کشت

Pm. tuscanum و *Pm. sicilianum hungicum* که از انگور جداسازی شده بودند شناسایی کنند. همچنین ۳ گونه *Pm. alvesii* و *Pm. griseorubrum rubrigenum* که قبلاً جزء پاتوژن های انسانی بودند از روی انگور جداسازی شدند. در مجموع ۲۶ گونه از جنس *Phaeoacremonium* شناسایی شده است که ۲۰ گونه ی آن از روی انگور و ۶ گونه از روی انسان جدا سازی شده است. گونه *Pm. aleophilum* نسبت به گونه های دیگر *Phaeoacremonium* پراکنش وسیعی داشته و بیشتر در باغات انگور آلوده شیوع دارد (۱۲).

مواد و روش ها

PDA(Potato و ۲%MEA (Malt Extract Agar
 Dextrose Agar) منتقل گردید. سپس پتری های کشت شده به انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد منتقل شدند.

نمونه برداری در سال ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ از مناطق بدرانلو، مملجه، لشکر (شهرستان بجنورد) و شهرستان فاروج از استان خراسان شمالی انجام شد و همچنین ۴ جدایه استاندارد از کشور ایتالیا بود. خصوصیات

جدول ۱- مشخصات جدایه های مورد بررسی قارچ های مرتبط با اسکا و محل جمع آوری و جدایه های استاندارد

| ردیف | کد جدایه | قارچ شناسایی شده | میزبان | محل جمع آوری |
|------|----------|--------------------------|--------|------------------|
| ۱ | Pm.1 | <i>Pm. aleophilum</i> | انگور | ایتالیا |
| ۲ | Pm.2 | <i>Pm. aleophilum</i> | انگور | مملجه - بجنورد |
| ۳ | Pm.3 | <i>Pm. aleophilum</i> | انگور | بدرانلو - بجنورد |
| ۴ | Pm.4 | <i>Pm. parasiticum</i> | انگور | مملجه - بجنورد |
| ۵ | Pm.5 | <i>Pm. parasiticum</i> | انگور | بدرانلو - بجنورد |
| ۶ | Pm.6 | <i>Pm. parasiticum</i> | انگور | فاروج - بجنورد |
| ۷ | Pm.7 | <i>Pm. parasiticum</i> | انگور | بدرانلو - بجنورد |
| ۸ | Pm.8 | <i>Pm. aleophilum</i> | انگور | لشکر - بجنورد |
| ۹ | Pm.9 | <i>Pm. parasiticum</i> | انگور | لشکر - بجنورد |
| ۱۰ | Pm.10 | <i>Pm. aleophilum</i> | انگور | لشکر - بجنورد |
| ۱۱ | Pch.1 | <i>Pa. chlamydospora</i> | انگور | ایتالیا |
| ۱۲ | Pch.2 | <i>Pa. chlamydospora</i> | انگور | بدرانلو - بجنورد |
| ۱۳ | Pch.3 | <i>Pa. chlamydospora</i> | انگور | بدرانلو - بجنورد |
| ۱۴ | Pch.4 | <i>Pa. chlamydospora</i> | انگور | فاروج - بجنورد |
| ۱۵ | Pch.5 | <i>Pa. chlamydospora</i> | انگور | لشکر - بجنورد |
| ۱۶ | Pch.6 | <i>Pa. chlamydospora</i> | انگور | مملجه - بجنورد |
| ۱۷ | Pch.7 | <i>Pa. chlamydospora</i> | انگور | فاروج - بجنورد |
| ۱۸ | Fme.1 | <i>F. mediterranea</i> | انگور | بدرانلو - بجنورد |
| ۱۹ | Fme.2 | <i>F. mediterranea</i> | انگور | بدرانلو - بجنورد |
| ۲۰ | Fme.3 | <i>F. mediterranea</i> | انگور | لشکر - بجنورد |
| ۲۱ | Fme.4 | <i>F. mediterranea</i> | انگور | فاروج - بجنورد |
| ۲۲ | Fme.5 | <i>F. mediterranea</i> | انگور | مملجه - بجنورد |
| ۲۳ | Fme.6 | <i>F. mediterranea</i> | انگور | ایتالیا |
| ۲۴ | Fme.7 | <i>F. mediterranea</i> | مرکبات | ایتالیا |

آغازگرهای ۱۰ نوکلئوتیدی از سری کامل آغازگرهای تصادفی ساخت شرکت سیناژن مورد استفاده قرار گرفتند. پس از بهینه‌کردن کلیه پارامترهای فیزیکی و بیوشیمیایی، آزمایش در واکنش‌های ۲۵ میکرولیتری صورت گرفت. تکثیر DNA در واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR10X، ۲ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۷۵ میکرومولار dNTPs، ۰/۵ میکرومولار آغازگر، ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۱/۵ واحد آنزیم تک پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی ۲ دقیقه در $94^{\circ}C$ ، ۴۰ سیکل با ۱ دقیقه در $92^{\circ}C$ ، ۱ دقیقه در $37^{\circ}C$ ، ۲ دقیقه در $72^{\circ}C$ و مرحله تکثیر نهایی با ۵ دقیقه در $72^{\circ}C$ انجام شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شدند. برای بررسی باندهای ایجاد شده در جدایه‌های مختلف از نشانگر ژنومی (DNA Ladder) با وزن ۱ kb و ۱۰۰ bp استفاده شد. عمل الکتروفورز با ولتاژ ۶۰ v/cm به مدت ۲ ساعت انجام شد. پس از آن ژل توسط محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ mg/l) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر رنگ زدایی شدند. و با استفاده از دستگاه ژل خوان در مقابل نور UV مرئی و از آن عکس گرفته شد. تصاویر حاصل از ژل‌های الکتروفورز DNA، که در آن قطعات تکثیر یافته توسط هر آغازگر به صورت باندهایی از هم تفکیک شده بودند، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌ها پس از انتقال به برنامه Excel به کدهای یک و صفر معرف حضور و عدم حضور باندها تبدیل و ماتریس داده‌های یک و صفر تهیه گردید.

به منظور آماده کردن جدایه جهت استخراج DNA ابتدا محیط کشت مایع (Potato Dextrose Broth) را تهیه و استریل کرده و سپس قطعه‌ای از میسلیوم هر جدایه را به این محیط اضافه کرده و بر روی شیکر با سرعت ملایم و در دمای 25 ± 1 به مدت ۱۵-۱۰ روز در تاریکی قرار داده شد.

استخراج DNA مطابق روش مورای و تامپسون (۱۴) اصلاح شده توسط روگرز و همکاران (۱۷) و کیم و همکاران (۱۱) انجام گرفت. به منظور مشاهده حضور یا عدم حضور DNA و تعیین کیفیت و یکپارچگی آن از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۷۵ v/cm حدوداً به مدت ۱ ساعت انجام گرفت. و پس از آن ژل توسط محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ mg/l) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر رنگ زدایی شد. پس از آن ژل توسط دستگاه ژل خوان مورد بررسی قرار گرفت. حضور تک باند شفاف با وزن مولکولی بالا نشانه DNA سالم و تجزیه نشده تلقی گردید. بررسی میزان و غلظت DNA استخراج شده و خلوص آن از طریق دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت. سپس برای اندازه‌گیری میزان خلوص DNA استخراج شده، نسبت جذب   اندازه‌گیری شد. در این تحقیق از ۱۰ آغازگر تصادفی بر اساس کارهای تگلی و همکاران (۱۸) برای بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌های *Phaeoacremonium*، *Phaeomoniella* و *Fomitiporia* استفاده گردید (جدول ۲).

جدول ۲- آغازگرهای تصادفی مورد استفاده

| آغازگر (Primer) | توالی (Sequence) |
|-----------------|----------------------|
| OPM2 | 5' - ACAAGGCCTC - 3' |
| OPM8 | 5' - TCTGTTCCCC - 3' |
| OPM12 | 5' - GGGACGTTGG - 3' |
| OPM18 | 5' - CACCATCCGT - 3' |
| OPM20 | 5' - AGGTCTTGGG - 3' |
| OPN4 | 5' - GACCGACCCA - 3' |
| OPN10 | 5' - ACAACTGGGG - 3' |
| OPN12 | 5' - GACAGACACC - 3' |
| OPN16 | 5' - AAGCGACCTG - 3' |
| OPB7 | 5' - GGTGACGCAG - 3' |

رویشی می باشد و در محیط کشت تولید هیچ گونه اسپوری نمی کنند و ساختار متمایز کننده ای نیز ندارند (شکل ۳- D).

آنالیز مولکولی RAPD در جنس *Phaeoacremonium*

واکنش RAPD با این ۱۰ آغازگر تصادفی بر روی جدایه های قارچ *phaeoacremonium* منجر به تکثیر ۳۷۶ جایگاه قابل نمره گذاری شدند. تعداد باندهای چند شکلی ایجاد شده ۳۱۶ و دامنه اندازه قطعات تکثیر شده در ۲۵۰۰-۳۰۰ bp بود. پنج آغازگر به نام های OPM8، OPN4، OPN10، OPN12، OPN16 چند شکلی ۱۰۰ درصد در بین جدایه ها نشان دادند و آغازگرهای OPM20 و OPB7 بهترین تنوع در بین جدایه ها را نشان دادند (شکل ۴). نتایج تجزیه کلاستر در یک دندروگرام با استفاده از روش UPGMA خلاصه شد. بر اساس این کلاستر در ابتدا جدایه ها در دو گروه A و B قرار گرفتند (شکل ۴).

نتایج محاسبه شباهت ژنتیکی در بین جدایه های گروه A، نشان داد که دو جدایه Pm.1 (از ایتالیا) و Pm.2 (از مملجه) با شباهت ۹۴/۶ درصد نسبت به سایر جدایه ها به هم نزدیکترند و قرابت و خویشاوندی بیشتری دارند و کمترین شباهت بین دو جدایه Pm.1 (از ایتالیا) و Pm.8 (از لشکر) با شباهت ۴۲/۹ درصد وجود دارد. در بین جدایه های گروه B، بیشترین شباهت بین دو جدایه Pm.5 و Pm.7 (هر دو از بدرانلو) با شباهت ۹۱/۷ درصد که نسبت به سایر جدایه ها به هم نزدیکترند و کمترین شباهت بین دو جدایه Pm.6 (از فاروج) و Pm.9 (از لشکر) با شباهت ۳۶/۷ درصد وجود دارد.

ماتریس تشابه بین جفت جدایه ها بر اساس ضریب جاکارد محاسبه و تجزیه کلاستر و رسم دندروگرام بر اساس روش UPGMA با استفاده از نرم افزار NTSYSpc 2.02 انجام شد.

نتایج و بحث

مشخصات ظاهری پرگنه *Phaeoacremonium parasiticum* روی محیط MEA، پس از ۱۶ روز سطح رویی به رنگ قهوه ای تا بژ مایل به خاکستری به سمت حاشیه می باشد (شکل ۳- A). پرگنه های این جدایه روی محیط PDA، پس از ۱۶ روز سطح رویی آن به رنگ قهوه ای می باشد.

مشخصات ظاهری پرگنه *Phaeoacremonium aleophilum* روی محیط MEA پس از ۱۶ روز سطح رویی آن به رنگ زرد روشن یا خاکستری می باشد (شکل ۳- B). پرگنه های این جدایه روی محیط PDA، پس از ۱۶ روز سطح رویی آن به رنگ بور تیره تا خاکستری مایل به قهوه ای در حاشیه دیده شد و پیگمان زرد نیز مشاهده گردید.

مشخصات ظاهری پرگنه *Phaeoacremonium chlamydospora* روی محیط MEA، به رنگ سبز زیتونی تا زیتونی سیاه می باشد. پرگنه های این جدایه دارای رشد مخمری در محیط کشت می باشند که باعث تمایز آن از جنس *Phaeoacremonium* می شود (شکل ۳- C).

مشخصات *Fomitiporia mediterranea* دارای پرگنه های سریع رشد عسلی رنگ تیره با بافت نمدی که تنها دارای رشد



(B) پرگنه *Pm. aleophilum*



(A) پرگنه *Pm. parasiticum*

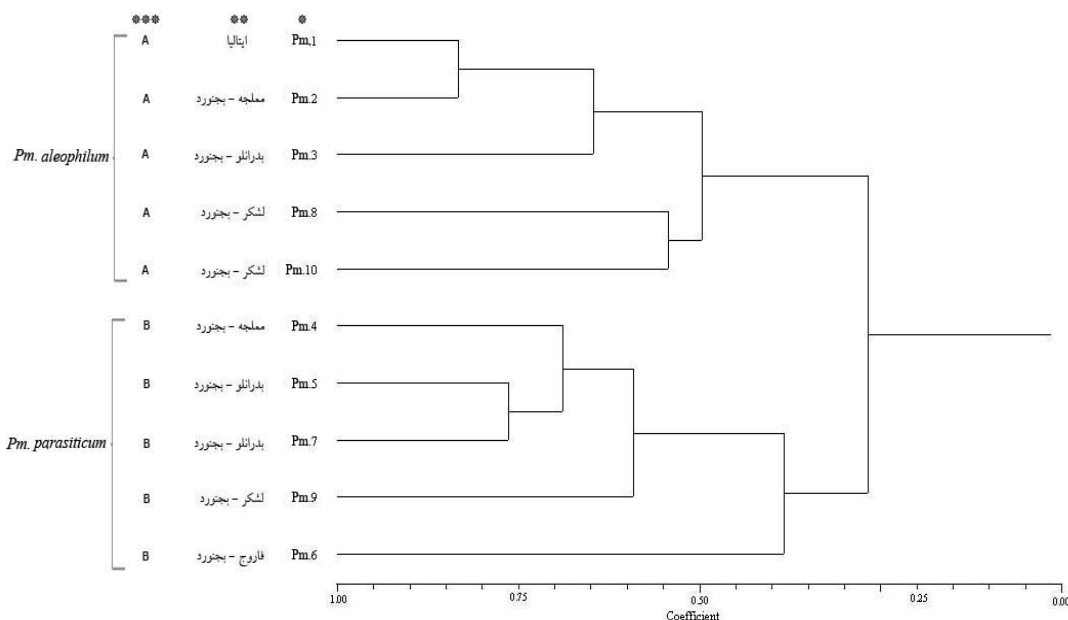


(D) پرگنه *F. mediterranea*



(C) پرگنه *Pa. chlamydospora*

شکل ۳- پرگنه *Pm. parasiticum* روی محیط MEA بعد از ۱۶ روز (A)، پرگنه *Pm. aleophilum* روی محیط MEA بعد از ۱۶ روز (B)، پرگنه *Pa. chlamydospora* روی محیط MEA بعد از ۱۶ روز (C)، پرگنه *F. mediterranea* روی محیط MEA بعد از ۱۶ روز (D)

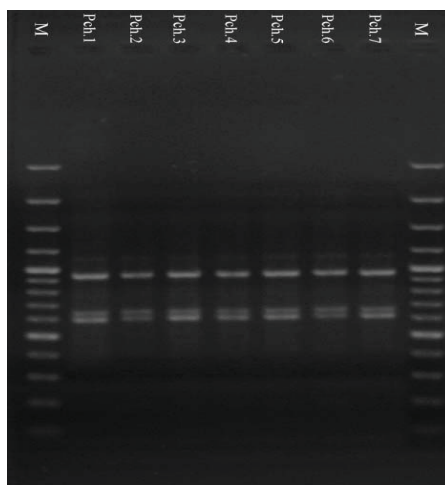


شکل ۴- دندروگرام رسم شده با استفاده از روش UPGMA برای جدایه های *Pm. parasiticum* و *Pm. aleophilum* در تکنیک RAPD
 * نام جدایه ها ** محل جمع آوری جدایه ها *** گروه بندی جدایه ها بر اساس گونه

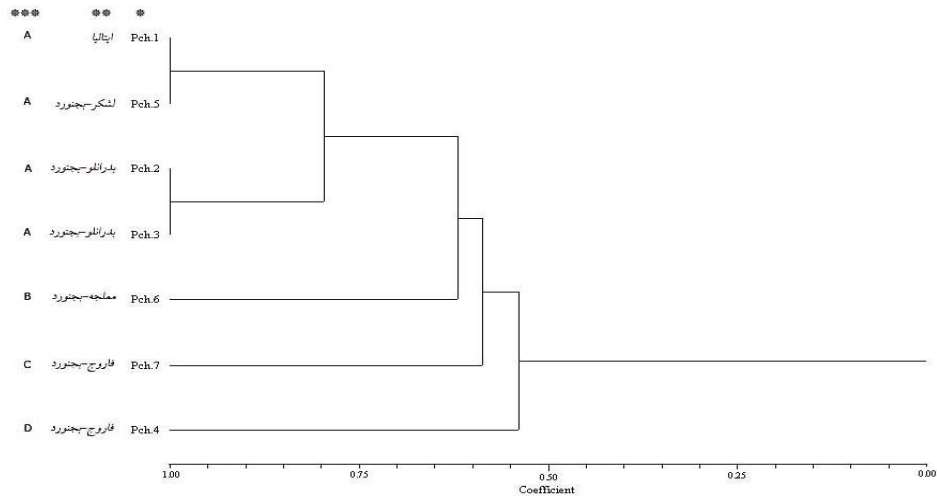
تجزیه RAPD شباهت ۱۰۰ درصد در بین جدایه های Pch.1 (از ایتالیا) با Pch.2 و Pch.3 (هر دو از بدرانلو) و کمترین شباهت بین دو جدایه Pch.6 (از مملجه) و Pch.7 (از فاروج) با شباهت ۶۸/۹ درصد را نشان داد. نتایج حاصل از آنالیز RAPD نشان داد که تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای *Pa. chlamydospora* بسیار اندک می باشد و جدایه هایی که از مناطق مختلف جمع آوری شده بودند بیشتر شبیه به هم هستند. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که نشانگرهای RAPD-PCR قادر نیستند جدایه‌ها را بر اساس مناطق جغرافیایی از هم تفکیک کند.

آنالیز مولکولی RAPD در جنس *Phaeomoniella*

تعداد کل باندهای قابل نمره‌گذاری ۲۹۲ باند بود به طوری که ۷۰ باند چند شکلی را نشان دادند و دامنه اندازه قطعات تکثیر شده ۲۵۰۰-۲۰۰ bp بود. دو آغازگر OPM12 و OPN16 بیشترین چند شکلی را نسبت به دیگر آغازگرها نشان دادند ولی در میان آغازگرهای به کار رفته، هیچ یک قادر نبود به تنهایی تمام جدایه ها را به‌عنوان ژنوتیپ های متفاوت تشخیص دهد (شکل ۵). آنالیز خوشه‌ای همه آغازگرها نشان داد که در سطح تشابه ۷۵ درصد، جدایه ها به چهار گروه ژنوتیپی از A تا D تفکیک می شوند (شکل ۶).



شکل ۵- الگوی باندی تکثیر شده از DNA جدایه های *Pa. chlamydospora* با استفاده از آغازگر OPN10؛ حرف M معرف وزنی ۱۰۰ bp می باشد.

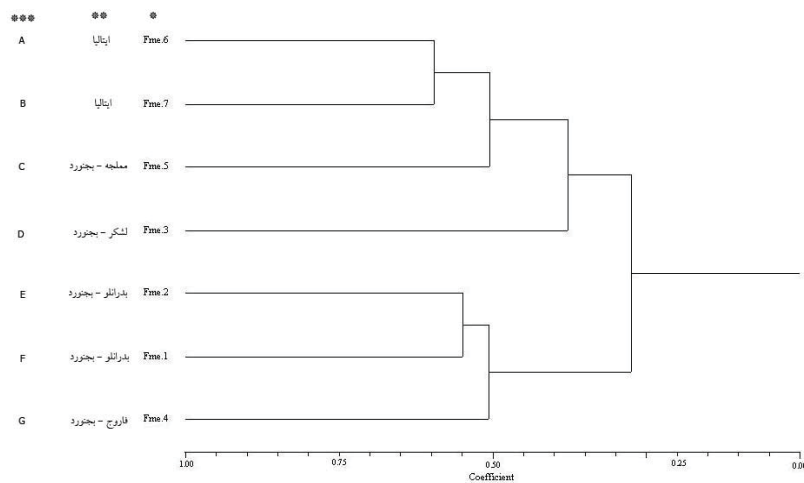


شکل ۶- دندروگرام رسم شده با استفاده از روش UPGMA برای جدایه های *Pa. chlamydospora* در تکنیک RAPD
* نام جدایه ها ** محل جمع آوری جدایه ها *** گروه بندی جدایه ها بر اساس شباهت ژنتیکی در سطح ۷۵ درصد

بر اساس نتایج آنالیز کلاستر در سطح شباهت ۷۵ درصد جدایه ها در هفت گروه ژنوتیپی از A تا G تفکیک شدند (شکل ۷). نتایج محاسبه شباهت ژنتیکی نشان داد که دو جدایه Fme.6 و Fme.7 (هر دو از ایتالیا) با شباهت ۷۱/۴ درصد نسبت به سایر جدایه ها به هم نزدیکترند و بعد از آن بیشترین شباهت بین دو جدایه Fme.1 و Fme.2 هر دو از بدرانلو با شباهت ۷۰/۶ درصد نسبت به سایر جدایه ها است. کمترین شباهت بین دو جدایه Fme.1 (از بدرانلو) و Fme.3 (از لشکر) با شباهت ۱۲/۹ درصد وجود دارد. نتایج این بررسی نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل توجهی در بین این گروه از قارچ ها وجود دارد و نشانگر RAPD نتوانست جدایه ها را بر اساس منطقه جغرافیایی از هم تفکیک کند.

آنالیز مولکولی RAPD در جنس *Fomitiporia*

در واکنش RAPD از ۱۰ آغازگر تصادفی برای مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه های قارچ *Fomitiporia mediterranea* استفاده شد. تعداد کل باندهای قابل نمره گذاری ۲۲۶ باند بود به طوری که ۱۷۰ باند چند شکلی را نشان دادند و دامنه اندازه قطعات تکثیر شده ۲۰۰-۲۵۰۰ bp بود (جدول ۴-۴). در بین این آغازگرها، آغازگر OPN16 بیشترین باند چند شکلی (۳۸ باند) و آغازگر OPM8 کمترین باند چند شکلی (۶ باند) را تولید کردند. پنج آغازگر به نام های OPN12، OPN10، OPM20، OPM8، OPB7 و OPM20 ۱۰۰ درصد در بین جدایه ها نشان دادند و آغازگرهای OPN12 و OPM20 بهترین تنوع در بین جدایه ها را نشان دادند.



شکل ۷- دندروگرام رسم شده با استفاده از روش UPGMA برای جدایه های *F. mediterranea* در تکنیک RAPD
* نام جدایه ها ** محل جمع آوری جدایه ها *** گروه بندی جدایه ها بر اساس شباهت ژنتیکی در سطح ۷۵ درصد

بحث و نتیجه گیری

Pm. aleophilum وجود دارد. همین گروه از محققین، ۹۴ جدایه از *Pa. chlamydospora* که از ۱۱ تاکستان مختلف در منطقه آپولیا جمع آوری شده بود را با استفاده از آغازگرهای تصادفی RAPD مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که بیشتر ایزوله ها از لحاظ ژنتیکی یکسان هستند و از جدایه های *Pm. angustium* و *Pm. inplatipes* متمایز شده اند. آنها پیشنهاد دادند که گردش ژن، مهاجرت و نو ترکیبی در داخل جمعیت این قارچ رخ نداده است و به نظر می رسد که مرحله جنسی در بیولوژی پاتوژن نقشی ندارد.

پلاسترو و همکاران (۱۶) با استفاده از آغازگرهای تصادفی RAPD قارچ *F. punctata* را بررسی کردند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که در جمعیت های مورد بررسی که حتی از یک تاکستان جمع آوری شده بودند، تنوع ژنتیکی بالایی وجود دارد و این دلالت بر این دارد که بازیدیوسپور نقش مهمی را در پراکنش پاتوژن ایفا می کند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تنوع ژنتیکی درون گونه ای نسبتاً بالایی در بین گونه های *Pm. aleophilum*، *Fomitiporia mediterranea* و *Pm. parasiticum* وجود دارد و تقریباً یکنواختی ژنتیکی در بین گونه *Pa. chlamydospora* مشاهده شد. نتایج این تحقیق نشان می دهد که تکنیک RAPD می تواند روش مناسبی برای تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچ های مولد اسکا باشد. لذا به نظر می رسد نشانگرهای DNA از جمله RAPD می تواند چشم انداز نوینی برای ارزیابی ارتباطات ژنتیکی در قارچ ها را فراهم سازد.

سپاسگزاری

از همکاری تمامی مسئولین و کارکنان مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی (بخش تحقیقات گیاهپزشکی) استان خراسان رضوی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

با توجه به عدم پایداری صفات شکل شناسی، تاثیرپذیری آزمون های بیماری زایی از شرایط محیطی، عدم توان گروه های سازگار رویشی در بیان تشابه ژنتیکی بین افراد گروه های سازگار رویشی مختلف و دشوار بودن ارتباط دهی بین صفات بالا، نیاز به کاربرد ابزار قدرتمند مولکولی که برخی از محدودیت های موجود غلبه نماید از اهمیت زیادی برخوردار است. قدرت و کارایی یک ترکیب آغازگری به عوامل زیر بستگی دارد: تعداد باندهایی که چند شکلی نشان داده اند، تعداد آل موثر و شاخص تنوع ژنی محاسبه شده برای هر جفت آغازگر که این دو رابطه مستقیم دارند. هر چه تعداد آل موثر بیشتر باشد، قدرت تمایز ژنتیکی بالاتر می رود یعنی ترکیب آغازگری مورد نظر در تفکیک تعداد بیشتری از جدایه ها سهم داشته است و توانسته است فاصله ژنتیکی جدایه ها را بهتر مشخص کند. با توجه به اهمیت بیماری زوال مو (اسکا) در خراسان شمالی و خسارت ناشی از آن در صورت عدم توجه به این بیماری، یکی از تهدیدهای خطرناک تاکستان های استان خراسان شمالی محسوب خواهد شد و مطالعه بر روی تنوع ژنتیکی عوامل ایجاد کننده این بیماری گامی موثر در جهت شناخت بهتر اپیدمیولوژی بیماری و مدیریت کنترل آن خواهد بود. این تحقیق با توجه به عدم اطلاعات ژنتیکی در زمینه عوامل قارچی اسکا در خراسان شمالی انجام گردید و نتایج آن می تواند نقش موثری در شناخت بروز احتمالی مرحله جنسی عوامل قارچی اسکا در پی داشته باشد. بررسی تنوع ژنتیکی صورت گرفته در این تحقیق بر اساس آغازگرهای تصادفی RAPD-PCR انجام شد و نتایج آن با گزارشات سایرین مطابقت دارد چنانچه می توان به برخی از آنها اشاره کرد:

تگلی و همکاران (۱۸) با استفاده از آغازگرهای تصادفی RAPD و RAMS نشان دادند که تنوع نسبتاً زیادی در میان جمعیت های

منابع

- ۱- محمدی ح. و بنی هاشمی ض. ۱۳۸۶. بیماری زوال مو در استان فارس. مجله بیماری های گیاهی، جلد ۴۳، صفحات ۲۹۴ تا ۳۱۱.
- 2- Ari M.E. 2000. A general approach for esca disease in the vineyard of Turkey. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 35- 37.
- 3- Cortesi P., Fischer M. and Milgroom M. 2000. Identification and spread of *Fomitiporia punctata* associated with wood decay of grapevine showing symptoms of esca disease. *Phytopathology*, 90: 967-972.
- 4- Crous P.W., Gams W., Wingfield M.J. and Wyk van P.S. 1996. *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline disease of woody hosts and human infections. *Mycologia*, 88: 786- 796.
- 5- Edwards J., Marchi G. and Pascoe I.G. 2001. Young esca in Australia. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(supplement): S303- S310
- 6- Essakhi S., Mugnai L., Crous P.W., Groenewald J.Z. and Surico, G. 2008. Molecular and phenotypic characterization of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca diseased grapevines. *Persoonia*,

- 21: 119- 134.
- 7- Fischer M. 2000. Grapevine wood decay and lignicolous basidiomycetes. *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1): 100-106.
 - 8- Fischer M. 2002. A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (hymenochaetales). *Mycological Progress*, 1: 315- 324.
 - 9- Fischer M. 2006. Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea*, 45(supplement): S30-S42.
 - 10- Karimi M. R., Mahmoodi B. and Kazemiyan M. 2001. First report of esca of grapevine in Iran. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(supplement) : S481.
 - 11- Kim W.K., Mauthe W., Hausner G. and Klassen G.R. 1990. Isolation of high molecular weight DNA and doublestranded RNAs from fungi. *Canadian Journal of Botany*, 68: 1898- 1902.
 - 12- Mostert L., Halleen F., Fourie P. and Crous P.W. 2006. A review of *Phaeoacremonium* species invoved in Petri disease and esca of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 45 (supplement): S12- S20.
 - 13- Mugnai L., Graniti L. and Surico G. 1999. Esca (black measles) and brown wood- streaking: two old and elusive disease of grapevine. *Plant Disease*, 83(5): 404- 418.
 - 14- Murray H.G. and Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acid Research*, 8: 4321- 4325.
 - 15- Overton B.E., Stewart E.L., Qu X., Wenner N.G. and Christ B.G. 2004. Qualitative real-time PCR-SEBR Green detection of petri disease fungi. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 403- 410.
 - 16- Pollastro S., Abbatecola A., Dongiovanni C. and Faretra, F. 2000. Usage of molecular markers (PCR-RAPD) for studying genetic variability in *Phellinus (Fomitiporia)* sp. *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1): 107- 111.
 - 17- Rogers S.O., Rehner S., Bledsoe C., Muller G. J. and Ammirati J. F. 1989. Extraction of DNA from Basidiomycetes for ribosomal DNA hybridization. *Candian Journal of Botany*, 67: 1235- 1243.
 - 18- Tegli S., Bertelli, E. and Surico G. 2000. Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR- based assay for the detection of *Pm. chlamydosporum* and *Pm. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1): 134- 149.
 - 19- Welsh J. and Mcclelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213- 7218.
 - 20- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalsky J. A. and Tingey S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by aritrary primers and useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6231- 6235.