مجله دانش گیاهپزشکی ایران
دوره ۴۱، شماره ۱، ۱۳۸۹ (۱۱۲-۱۰۳)

بررسی تنوع ژنتیکی برخی از جدایه‌های قارچ *Macrophomina phaseolina* با استفاده از نشانگرهای مولکولی PCR-RFLP و RAPD

اکرم بخشی[1]*، حسن رضا اعتباریان[2]، حشمت‌اله امینیان[3] و محسن ابراهیمی[4]
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و استادیاران پردیس ابوریحان دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۱ - تاریخ تصویب: ۸۹/۵/۱۹)

چکیده

پوسیدگی ذغالی با عامل *Macrophomina phaseolina* یکی از بیماریهای مهم اقتصادی می‌باشد که سبب کاهش عملکرد در گیاهان زراعی و باغی می‌شود. تعداد ۳۳ جدایه از قارچ *M. phaseolina* بدست آمده از میزبان‌های متفاوت مانند سویا، خربزه، لوبیا، نخود، کاج، کوکب‌کوهی، کیوی، پنبه و کنجد جمع‌آوری شدند. شدت بیماریزایی جدایه‌ها روی بذور خربزه در شرایط آزمایشگاه ارزیابی شد. جهت بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها از نشانگرهای مولکولی RAPD و PCR-RFLP استفاده شد. تکثیر نواحی ITS با استفاده از آغازگرهای ITS5 و LR5 تنها یک قطعه DNA ۱۶۰۰ جفت بازی را تولید کرد. نتایج نشان داد که با کاربرد نشانگرهای RAPD تنوع ژنتیکی بین جدایه‌ها وجود دارد. داده‌های RAPD بر اساس پنج آغازگر تصادفی در ۱۶ جدایه، درجه بالایی از چندشکلی را در جدایه‌های مختلف نشان دادند. دندروگرام به روش UPGMA که با داده‌های RAPD رسم شد، نه گروه در سطح شباهت ۷۰ درصد ایجاد کرد. جدایه‌های که از مناطق مشابه بودند تمایل به گروه‌های نزدیک را داشته که نشان دادند که از نظر ژنتیکی به هم مرتبط‌اند.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی ذغالی، نواحی ITS ،تنوع زیستی، ژنوم.

مقدمه

قارچ *Macrophomina.phaseolina* (Tassi) Goid. یک گونه خاکزی و مونوتیپیک با طیف وسیع میزبانی، شامل بیش از ۵۰۰ گونه از ۷۵ خانواده گیاهی می باشد که در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری شیوع دارد (Dhingra & Sinclair, 1978). بارزترین نشانه بیماری روی خربزه، سیاه شدن ساقه است که ابتدا به صورت لکه‌ای در نزدیکی طوقه گیاه و یا روی ساقه ظاهر می‌شود. این لکه ابتدا زیتونی رنگ بوده و با گذشت زمان کدر شده تا سرانجام قهوه‌ای و سیاه می‌گردد و تا وقتی که تمام طوقه را فرا نگرفته است، گیاه به خوبی رشد و نمو می‌نماید. لکه در موقعی که هنوز زیتونی است معمولاً سطحی بوده و فقط نسج سطحی را تخریب می‌کند (Etebarian, 1983). در سال ۲۰۰۶ با بررسی توالیDNA ریبوزومی ثابت شد که قارچ *M. phaseolina* عضوی از خانواده Botryosphaeriaceae بوده، اگرچه مرحله جنسی آن ناشناخته است (Crous *et al*., 2006). اولین گزارش از آلودگی انسان به قارچ بیماریزایی

* نویسنده مسئول: اکرم بخشی تلفن: ۰۹۱۱-۲۲۳۱۸۶۱ E-mail: akram.bakhshi@yahoo.com

گیاهی، *M. phaseolina*، در سال ۲۰۰۸ در مجله قارچ شناسی پزشکی ارائه شد (Darrell *et al*., 2008). یکی از روشهای توصیه شده برای کنترل بیماری استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. جهت اصلاح و انتخاب ارقام مقاوم، آگاهی از وضعیت ژنتیکی در داخل جمعیت‌های قارچ عامل بیماری از اهمیت زیادی برخوردار است. همچنین شناخت ساختار ژنتیکی جمعیت بیمارگر برای اتخاذ سایر راهکارهای مفید در کنترل بیماری، سودمند و ضروری می‌باشد (McDonald *et al*., 1990). با شناخت مقدار تنوع ژنتیکی عوامل بیماریزا در نواحی مختلف می‌توان قرنطینه بیماری‌های گیاهی را بهتر اداره کرد. مطالعه تنوع ژنتیکی عوامل بیماریزا ممکن است اطلاعاتی را در خصوص منشاء عوامل بیماریزا و الگوی پراکنش آن‌ها که در اثر عوامل محیطی و انسانی به‌وجود می‌آیند در اختیار قرار دهد. این گونه مطالعات ممکن است راه‌های دیگری را جهت مدیریت عوامل بیماریزا پیش روی قرار دهد (Bagheri *et al*., 2002). ژنهای ریبوزومی هسته‌ای در دو گروه ۱۸S زیر واحدهای کوچک ریبوزومی، ۵/۸ S و ۲۸ S ویژه زیر واحد بزرگ ریبوزومی قرار می‌گیرند. فاصله بین قطعات ۲۸S و ۱۸S را دو قطعه توالی قابل رونویسی (ITS1 و ITS2) و یک قطعه ۵/۸ S پرکرده است (Bruns *et al*., 1991). تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف قارچ *M. phaseolina* بر اساس نشانگر SSR یا ریزماهواره بدست آمده از دو میزبان سویا و پنبه در دو منطقه هند و آمریکا بررسی شده است. شباهت ژنتیکی بین جدایه‌ها با استفاده از آنالیز خوشه‌ای و دندروگرام بدست آمده، در این بررسی، جدایه‌ها در سه گروه مشخص برطبق میزبان و نواحی جغرافیایی آنها تفکیک شدند (Jana *et al*.,2005).

هدف از تحقیق حاضر بررسی برخی از ویژگی‌های مورفولوژیکی، تعیین شدت بیماریزایی و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های بدست آمده قارچ از مناطق مختلف، تعیین میزان قرابت ژنتیکی آنها، بررسی وجود تنوع در داخل جمعیت و شناسایی تعداد هاپلوتیپ‌های موجود در داخل جمعیت‌های قارچ عامل بیماری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه شانزده جدایه با نمونه‌گیری از بوته‌هایی که دارای علائم مشکوک به این بیمارگر بودند از مزارع اطراف ورامین جمع‌آوری گردیدند. همچنین دو جدایه از آزمایشگاه بیماری‌شناسی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، ۱۳ جدایه از کلکسیون بخش گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، یک جدایه از شیراز و یک جدایه از مرکز تحقیقات ورامین مورد بررسی قرار گرفتند (جدول۱).

جدول۱- مشخصات جدایه‌های قارچ *Macrophomina phaseolina* مورد استفاده

ردیف	محل جمع‌آوری	نام گیاه آلوده	نام جدایه
۱	ملک زینل- ورامین	*Cucumis melo*	ZZ-01
۲	بشمک- ورامین	*Cucumis melo*	MB-02
۳	ملک زینل- ورامین	*Cucumis melo*	MZ_1-03
۴	ملک زینل- ورامین	*Cucumis melo*	MZ_2-04
۵	ملک زینل- ورامین	*Cucumis melo*	MZ_3-05
۶	ملک زینل- ورامین	*Cucumis melo*	ML-O6
۷	ملک زینل- ورامین	*Cucumis melo*	MH_1-07
۸	حسن حصارک- ورامین	*Cucumis melo*	MH_2-O8
۹	پیشوا- ورامین	*Cucumis melo*	PI-09
۱۰	پیشوا-ورامین	*Cucumis melo*	PI-10
۱۱	ایوانکی- سمنان	*Cucumis melo*	ME-11
۱۲	ایوانکی- سمنان	*Cucumis melo*	ME-12
۱۳	گرمسار- سمنان	*Cucumis melo*	MG-13
۱۴	ورامین- تهران	*Cucumis melo*	VA-14
۱۵	مرکز تحقیقات ورامین	*Cucumis melo*	ZA-15
۱۶	شیراز- فارس	*Cucumis melo*	SH-16
۱۷	لب لات- ورامین	*Phaseolus vulgaris*	LB-17
۱۸	پاکدشت-تهران	*Rudbeckia hirta*	KP-18
۱۹	آزمایشگاه پردیس	*Cucumis melo*	$M_1$19
۲۰	آزمایشگاه پردیس	*Cucumis melo*	M_2-20
۲۱	گرگان-گلستان	*Glycine max*	SG-21
۲۲	گرگان-گلستان	*Glycine max*	SS-22
۲۳	گرگان- گلستان	*Glycine max*	SO-23
۲۴	کردکوی-گرگان	*Glycine max*	SK-24
۲۵	گرگان-گلستان	*Glycine max*	SM-25
۲۶	گرگان-گلستان	*Gossypium* sp.	CG-26
۲۷	کردکوی-گرگان	*Gossypium* sp.	CK_1-27
۲۸	کردکوی-گرگان	*Gossypium* sp.	CK_2-28
۲۹	گرگان-گلستان	*Sesamum indicum*	SO-29
۳۰	گرگان-گلستان	*Pinus sp*	Pi -30
۳۱	گرگان- گلستان	*Pisum sativum*	Pe-31
۳۲	گرگان- گلستان	*Actiniadia deliciosa*	Ki-32
۳۳	گرگان-گلستان	*Cucumis melo*	MG-33

بررسی‌های مورفولوژیکی

پس از خالص‌سازی قارچ به روش نوک ریسه، ویژگی‌های مشخص پرگنه قارچ (رنگ پرگنه، حضور و عدم حضور میسلیوم‌های هوایی، و شکل پرگنه و اندازه میکرواسکلروت) از هر جدایه به روش میک‌پرز محاسبه شد (Mayek-Perez *et al*., 2002). شدت بیماریزایی ۳۳ جدایه در آزمایشگاه و در مرحله گیاهچه‌ای و هشت روز پس از مایه‌زنی بذرهای خربزه رقم سمسوری با استفاده از مقیاس ارزیابی شدت بیماری (scale) (جدول۲) بررسی شد (Manici *et al*., 1995). تجزیه شدت بیماریزایی جدایه‌ها در غالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزارSAS صورت گرفت.

جدول ۲ - مقیاس ارزیابی شدت بیماری ایجاد شده توسط *Macrophomina phaseolina* در شرایط آزمایشگاهی (Manici *et al*., 1995)

شماره (scale)	علائم
۰	بذر سالم باقی ماند
۱	بی‌رنگی قسمتی از گیاهچه که در تماس با میسلیوم است پوسته‌های بذر توسط میسلیوم و اسکلروت کلنیزه شده ولی
۲	گیاهچه سالم مانده است
۳	پوسته‌های بذر عاری از قارچ وگیاهچه آلوده شده است
۴	هم پوسته وهم بذر آلوده شده است
۵	بذر آلوده شده و جوانه نزده است

بررسی‌های مولکولی

به منظور استخراج DNA ژنومی، تولید توده میسلیومی جدایه‌ها در محیط کشت مایع (Broth Malt-yeast extract (MYB) شامل کشت داده شدند. برای این منظور ۳۰ میلی لیتر از محیط کشت مذکور تهیه و درون یک ظرف ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس درب ارلن‌ها با پنبه و فویل آلومینیومی کاملاً مسدود و درون اتوکلاو استریل گردیدند. سپس در شرایط استریل زیر هود لامینار با یک اسکالپل از میکرواسکلروت قارچ عامل بیماری واقع در روی محیط کشت PDA برداشته شده و درون محیط کشت مایع قرار داده شد. سپس ارلن‌ها در دمای ۲±۲۸ درجه سلسیوس به مدت یک هفته قرار داده شدند. پس از این که قارچ عامل بیماری به صورت یک لایه سطح محیط کشت مذکور را پوشانید، در شرایط استریل توده میسلیومی از محیط کشت جدا شده، بین چند لایه کاغذ صافی استریل کاملاً خشک گردید. سپس یک فویل آلومینیومی استریل دور آن پیچیده شد. و به دمای فریزر۸۰- درجه سلسیوس انتقال داده شدند. استخراج DNA به روش ویلند انجام شد (Weiland, 2002) .

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از نشانگر PCR-RFLP

با استفاده از آغازگر LR5 و ITS5 (White *et al*., 1990) با توالی‌های که توسط شرکت MWG bioteack آلمان به نمایندگی شرکت فرایند دانش آرین سنتز شده بودند انجام شد.

ITS5:5́- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3́
LR5: 5́- TCCTGAGGGAAACTTCG-3́)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در محلول واکنش به حجم ۲۰ میکرولیتر شامل: شامل، ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ ۲میلی مولار، ۲ میکرولیتر بافر (PCR 10X ۲۰ میلی‌مولار Tris-Hcl با pH ~ 8)، ۲میکرولیتر مخلوط dNTPs، ۲/۵، ۲ میلی مولار، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگر پائین دست و بالا دست با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۰/۲ میکرولیتر *Taq* DNA polymerase (5u/ml)، ۱میکرولیتر DNA الگو به غلظت۵۰ نانوگرم در میکرولیتر و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه دوبار تقطیر و سترون برای هر واکنش بود. جهت تعیین دمای جفت شدن آغازگرها با DNA الگو، از شیب دمای ۶۲-۵۲°C در دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad, Chini) استفاده شد. این قطعه از ژنوم با برنامه حرارتی ۵ دقیقه در ۹۵°C، ۳۰ چرخه با ۱ دقیقه در ۹۵°C، ۱دقیقه در ۵۵°C، ۱ دقیقه در ۷۲°C، و مرحله تکثیر نهایی با ۱۰ دقیقه در ۷۲°C انجام شد. برای مشاهده محصول PCR ازالکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TAE 1X با ولتاژ ۷۵ میلی‌ولت استفاده شد. ژل‌ها با قرار دادن به مدت ۱۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۱۰mg/ml رنگ‌آمیزی شدند، سپس به همین مدت در آب مقطر شستشو داده شدند و با استفاده از دستگاه (Gel Doc Trans luminated) در مقابل نور UV مرئی شده، تصویر ژل برای آنالیز تهیه گردید. هضم محصول واکنش PCR توسط آنزیم‌های برشی*Hae* III ، *Rsa* I، *Mbo* I، *pae* I (MBI Fermentas) که از شرکت سیناژن خریداری شد.

جهت مشاهده قطعات حاصل از برش از الکتروفورز در ژل آگارز دو درصد در بافر TAE 1X استفاده شد (Purkayastha, 2005).

نشانگر RAPD

برای انجام آزمایشات RAPD از ۱۶ جدایه (شامل هشت جدایه از خربزه، دو جدایه از سویا، یک جدایه از هر کدام از میزبان‌های پنبه، کوکب‌کوهی، لوبیا، کیوی، نخود و کنجد) انتخاب شدند. از پنج آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی (تهیه شده از کمپانی FAZA Biotech) استفاده شد. برای اطمینان از تکرارپذیری باندها واکنش RAPD برای هر آغازگر حداقل دو بار تکرار شد (جدول۳).

جدول ۳ - پرایمرهای RAPD استفاده شده

شماره	نام آغازگر	توالی
۱	a_4	5´-AATCGGGCTG-3´
۲	e_3	5´-CCAGATGCAC-3´
۳	m_3	5´-GGGGGATGAG-3´
۴	b_{11}	5´-GTAGACCCGT-3´
۵	10mer F	5´-TGCCGAGCTG-3´

ترکیب مواد واکنش در نشانگرRAPD در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل: ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ ۲ میلی‌مولار، ۱/۶ میکرولیتر بافر (PCR 10X ۲۰میلی‌مولار Tris-HCl با pH~8)، ۲ میکرولیتر مخلوط۲/۵ میلی‌مولار dNTPs، ۱میکرولیتر آغازگر با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۰/۲ میکرولیتر *Taq* DNA polymeras، ۱ میکرولیتر DNA الگو به غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر و ۱۳/۴ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه دوبار تقطیر و سترون برای هر واکنش بود. برنامه حرارتی ۵ دقیقه در ۹۵°C، ۴۵ چرخه با ۱ دقیقه در ۹۵°C، ۴۵ ثانیه در ۳۶°C، ۳۰ ثانیه در ۷۲°C، و مرحله تکثیر نهایی با ۱۰ دقیقه در ۷۲°C انجام شد. قطعات تکثیر شده در هر واکنش با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TAE 1X از یکدیگر تفکیک شدند (Almeida *et al.*, 2003). مرحله رنگ‌آمیزی و تهیه تصویر ژل مشابه نشانگر اول انجام شد. جهت تجزیه داده‌های مولکولی ماتریس یک و صفر. تهیه شد و جهت تجزیه خوشه‌ای و رسم دندروگرام از نرم‌افزار (PAlaeontological Statistics (PAST)) استفاده شد (Hammere *et al.*, 2007). جهت اطمینان از نتایج آن با نرم‌افزارهای NTsys ver 2.02 و MVSP ver 3.131 مقایسه شد.

نتایج و بحث

برخی از ویژگی‌های مورفولوژیک پرگنه و شاخص بیماریزایی (جدول ۴) آورده شده است. میانگین شدت بیماریزایی جدایه‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح ۱٪ اختلاف معنی داری نشان دادند. در آزمون شدت بیماریزایی تمامی جدایه‌ها قادر به ایجاد علائم بیماری در روی گیاهچه‌های خربزه بوده و جدایهMB-02 و M_1-19 به ترتیب با شاخص بیماریزایی ۴/۴ و ۱/۰۶ دارای بیشترین و کمترین قدرت بیماریزایی بودند. جدایه MB-02 از جدایه‌هایی بوده که به تازگی و با نمونه‌گیری از مزارع ورامین جداسازی شده بود و بیماریزایی خود را همچنان حفظ کرده است، جدایه M_1-19 از آزمایشگاه پردیس ابوریحان احتمالا به دلیل کشت‌های مجدد زیاد از آن سبب کاهش قدرت بیماریزایی این جدایه شده باشد و با شاخص، کمترین قدرت بیماریزایی روی بذور و گیاهچه‌های خربزه از خود نشان دادند. تنوع بیماریزایی این قارچ به علت جهش و ترکیب هیفی و نوترکیب‌های میتوزی نسبت داده می‌شود. سرعت رشد و یا گسترش میسلیوم و فراوانی حضور اسکلروت‌ها به علت شرایط محیطی مناسب می‌باشد که می‌تواند عاملی برای تنوع این بیمارگر مورد توجه قرارگیرد (Jimenez Diaz *et al.*, 1983). Beas-Fernandez *et al.* (2006) با بررسی شدت بیماریزایی روی بذور لوبیا پیشنهاد نمودند، تفاوت‌های مورفولوژیک و بیماریزایی بین جدایه‌ها می‌تواند بر اساس منشا جغرافیایی به‌وجود آمده باشد. یعنی بین قدرت بیماری‌زایی و منشا جغرافیای جدایه‌های ارتباط وجود دارد، در بررسی ویژگی‌های پرگنه، جدایه‌های که پرگنه رشد نامنظمی را نشان می‌دادند، تعداد بیشتری از جدایه‌ها را در برمی‌گرفت. رنگ پرگنه در بیشتر جدایه‌ها سیاه تشخیص داده شد این نتایج مشابه Beas-Fernandez *et al.* (2006) تا حدودی مشابه بود.

در بررسی همبستگی برخی از صفات جدایه‌ها (اندازه میکرواسکلروت، شدت بیماریزایی و وجود ریسه هوایی)،

همبستگی مثبت و معنی‌داری (r=۰/۵۸۱۶۰) بین که داشتن ریسه هوایی و بیماریزایی مشاهده شد (جدول۵). تفاوت در اندازه میکرواسکلروت در جدایه‌های دو منطقه تا حدودی محسوس بود. اندازه میکرواسکلروت در جدایه‌های مکزیک به طول ۱۱۲-۳۲۴µm و عرض ۷۸-۱۹۶µm و با نسبت طول به عرض ۱/۷-۱/۲ نسبت به جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق، طول میکرواسکلروت‌ها حدود ۸۴/۶۸-۱۲۸/۴۵ µm و عرض

جدول ۴ - مشخصات مورفولوژیک و بیماریزایی جدایه‌های قارچ *Macrophomina phaseolina*

نام جدایه	رنگ پرگنه	میسلیوم هوایی*	شکل پرگنه	شاخص بیماریزایی	نسبت طول به عرض (Length/width)
ZZ-01	قهوه‌ای	++	نامنظم	۲/۷±۰/۳۷bc***	۱/۱۹±۰/۰۳
MB-02	قهوه‌ای	++	نامنظم	۴/۴±۰/۰۳a	۱/۱۶±۰/۰۲
MZ_1-03	سیاه	++	نامنظم	۳/۹±۰/۰۳a	۱/۱۴±۰/۰۲
MZ_2-04	سیاه	++	نامنظم	۳/۹±۰/۲۶a	۱/۱۸±۰/۰۲
MZ_3-05	سیاه	+++	نامنظم	۲/۷±۰/۳۵bc	۱/۱۸±۰/۰۲
ML-O6	سیاه	+++	نامنظم	۳±۰/۰۶b	۱/۱۷±۰/۰۲
MH_1-07	سیاه	+++	نامنظم	۳/۹±۰/۲۶a	۱/۱۶±۰/۰۲
MH_2-O8	سیاه	+++	نامنظم	۳±۰/۴۶b	۱/۱۶±۰/۰۲
PI_1-09	سیاه	+++	نامنظم	۲/۷±۰/۱۴bc	۱/۱۵±۰/۰۲
PI_2-10	سیاه	+++	نامنظم	۲/۶±۰/۱۱bc	۱/۱۲±۰/۰۱
ME-11	سیاه	+++	نامنظم	۳/۱±۰/۶b	۱/۱۳±۰/۰۲
ME-12	سیاه	+++	نامنظم	۲/۹±۰/۱bc	۱/۱۷±۰/۰۲
ME-13	سیاه	+++	نامنظم	۲/۷±۰/۰۶bc	۱/۱۹±۰/۰۲
VA-14	سیاه	++	نامنظم	۲/۶±۰/۶۶bc	۱/۰۷±۰/۰۱
ZA-15	سیاه	+	نامنظم	۱/۶±۰/۰۳def	۱/۱۵±۰/۰۲
SH-16	سیاه	+	نامنظم	۱/۵±۰/۰۳def	۱/۱۵±۰/۰۲
LB-17	سیاه	++	نامنظم	۲/۷±۰/۳bc	۱/۱۸±۰/۰۲
KP-18	سیاه	++	نامنظم	۲/۵±۰/۲۳bc	۱/۱۶±۰/۰۱
M_1-19	سیاه	+	دایره‌ای	۱/۱±۰/۱۶f	۱/۱۹±۰/۰۲
M_2-20	خاکستری	+	دایره‌ای	۲/۳±۰/۰۳ef	۱/۲۰±۰/۰۲
SG-21	خاکستری	++	دایره‌ای	۱/۴±۰/۰۳ef	۱/۲۲±۰/۰۳
SS-22	خاکستری	++	دایره‌ای	۱/۶±۰/۱۱def	۱/۲۱±۰/۰۳
SO-23	سیاه	+	بیضوی	۲/۳±۰/۳۳bcde	۱/۱۳±۰/۰۲
SK-24	خاکستری	+	بیضوی	۲/۴±۰/۲۹bcd	۱/۲۳±۰/۰۲
SM-25	خاکستری	+	دایره‌ای	۲/۶±۰/۱۶bc	۱/۲۳±۰/۰۲
CG-26	سیاه	+	دایره‌ای	۱/۴±۰/۱۶ef	۱/۱۹±۰/۰۲
CK_1-27	سیاه	+	بیضوی	۱/۰۶±۰/۰۶f	۱/۱۹±۰/۰۲
CK_2-28	سیاه	+	دایره‌ای	۲/۳±۰/۳۳bcde	۱/۱۶±۰/۰۱
SO-29	سیاه	+	دایره‌ای	۲/۱±۰/۲def	۱/۱۵±۰/۰۱
PI-30	سیاه	+	بیضوی	۲/۳±۰/۳۳bcde	۱/۱۷±۰/۰۲
Pe-31	سیاه	+	نامنظم	۱/۴±۰/۰۳ef	۱/۱۷±۰/۰۲
ki-32	خاکستری	++	دایره‌ای	۲/۳±۰/۳۳bcde	۱/۱۹±۰/۰۲
MG-33	سیاه	+	دایره‌ای	۲/۳±۰/۳۳bcde	۱/۲۵±۰/۰۴

*خطای معیار

**: +++ میسلیوم‌های که رشد هوایی زیادی دارند. ++ تعداد میسلیوم‌های که رشد هوایی متوسط دارند. + تعداد میسلیوم‌های که رشد هوایی کمی دارند (Manici *et al*.,1995; Mayek-Perez et al., 2002).

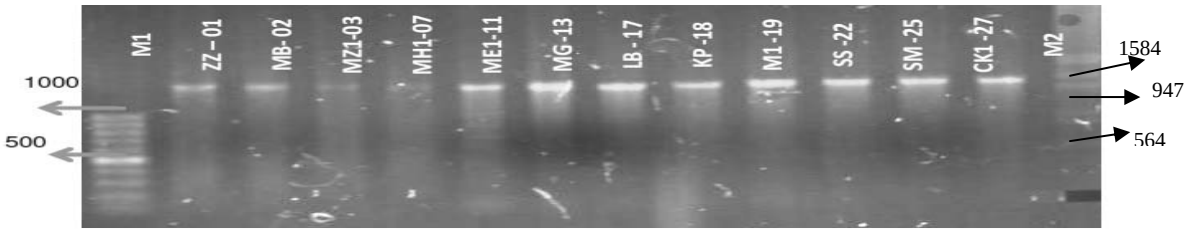
۷۰/۶۲-۱۱۸/۰۲μm بود و نسبت طول به عرض ۱/۱-۱/۲ (جدول ۴) حاکی از تفاوت‌های محسوس بین جدایه‌های دو مکان می‌باشد. بررسی‌ها نشان داد بین داشتن ریسه هوایی و بیماریزایی همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد. و می‌توان این‌گونه توجیه کرد که جدایه‌هایی که دارای قدرت بیماریزایی بیشتری بوده ریسه‌های هوایی بیشتری دارند، تمایل به رشد رویشی به سمت بیرون از تشتک پتری را داشته و با بررسی‌های بیشتر مشخص شد که جدایه‌هایی که از روی گیاه بیمار (در گلخانه جهت اثبات بیماریزایی) جدا می‌شدند این ویژگی را داشته و ریسه‌های هوایی بیشتر و بیماریزایی بیشتری داشتند.

اتصال آغازگرهای ITS5 و LR5 در دمای ۵۵ درجه سلسیوس صورت گرفت. تمامی جدایه‌ها باندهایی با وزن مولکولی ۱۶۰۰bp ایجاد کردند (شکل۱).

جدول۵- همبستگی برخی صفات جدایه ها در قارچ *Macrophomina phaseolina*

	بیماریزایی	اندازه میکرواسکلروت	ریسه هوایی
بیماریزایی	۱		
اندازه میکرواسکلروت	۰/۰۴۶۳۱	۱	
ریسه هوایی	۰/۵۸۱۶*	۰/۱۴۲۵۹	۱

* در سطح ۵ درصد اختلاف معنی دار وجود دارد.

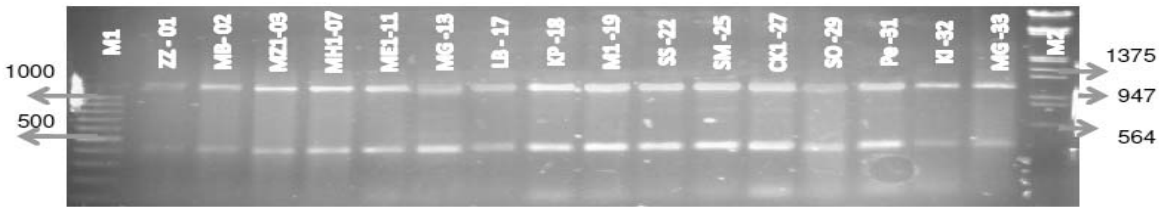


شکل۱- الگوی باندی محصول PCR جدایه‌های قارچ *Macrophomina phaseolina* با آغازگرهای LR5 و ITS5 (اعداد درج شده در بالای شکل شماره جدایه‌های مورد بررسی می‌باشد و M1 معرف نشانگر وزنی DNA 100bp و M_2 معرف نشانگر DNA 1kbp).

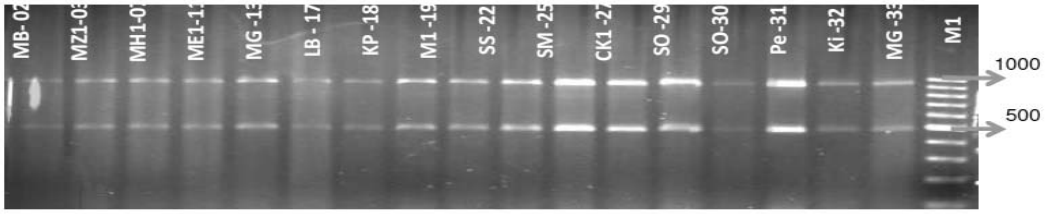
تیمار محصول PCR با آنزیم‌های *Hae* III، *Pae* I، *Mbo* I، *Ras* I صورت گرفت. هر چهار آنزیم دارای محل برش و شناسایی بودند (جدول۶) و (شکل۲، ۳، ۴ و ۵). چند شکلی در طول نواحی ITS وS rDNA ۵/۸ و قسمتی از ۲۵S rDNA، در بین جدایه‌های مورد بررسی، مشاهده نشد.

جدول۶- طول قطعات حاصل از برش نواحی ITS در جدایه‌های قارچ *Macrophomina phaseolina*

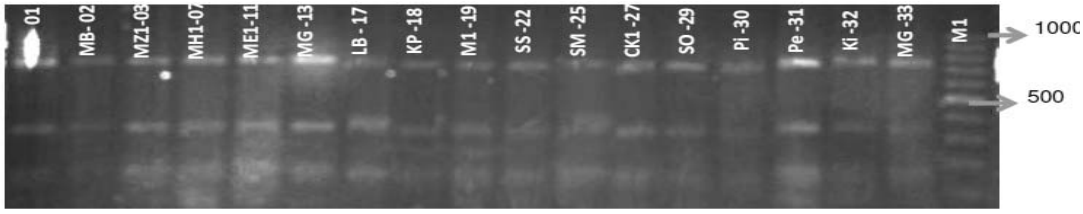
آنزیم‌های برشی	محصول حاصل از برش (bp)
Rsa I	۵۰۰،۱۰۰۰
Hae III	۱۵۰، ۳۵۰، ۸۰۰
Pae I	۱۲۰۰، ۴۰۰
Mbo I	۱۷۰، ۳۴۰، ۴۰۰



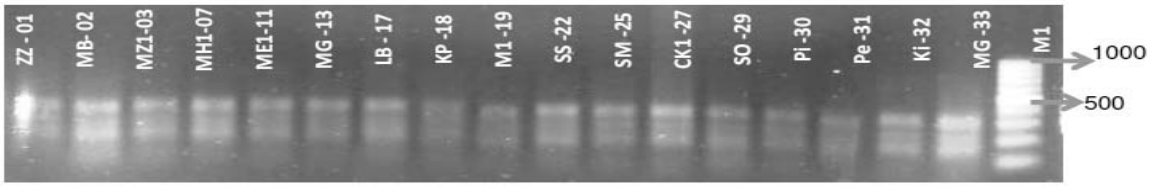
شکل ۲- الگوی باندهای محصولات PCR جدایه‌های قارچ *Macrophomina phaseolina* هضم شده با آنزیم برشی *Pae I* (اعداد درج شده در بالای شکل، شماره جدایه‌های مورد بررسی و M1 معرف نشانگر وزنی DNA 100bp و M_2. معرف نشانگر DNA، 1kbp).



شکل ۳-الگوی باندهای محصولات PCR جدایه‌های قارچ *Macrophomina phaseolina* هضم شده با آنزیم برشی *Ras* I (اعداد درج شده در بالای شکل، شماره جدایه‌های مورد بررسی و M1 معرف نشانگر وزنیDNA 100bp و M_2. معرف نشانگر DNA، 1kbp).



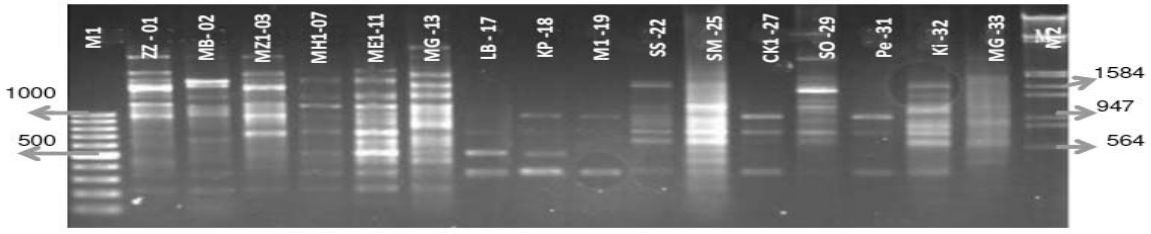
شکل ۴-الگوی باندهای محصولات PCR جدایه‌های قارچ *Macrophomina phaseolina* هضم شده با آنزیم برشی *Hae* III (اعداد درج شده در بالای شکل، شماره جدایه‌های مورد بررسی و M1 معرف نشانگر وزنی DNA 100bp و M_2. معرف نشانگر DNA، 1kbp).



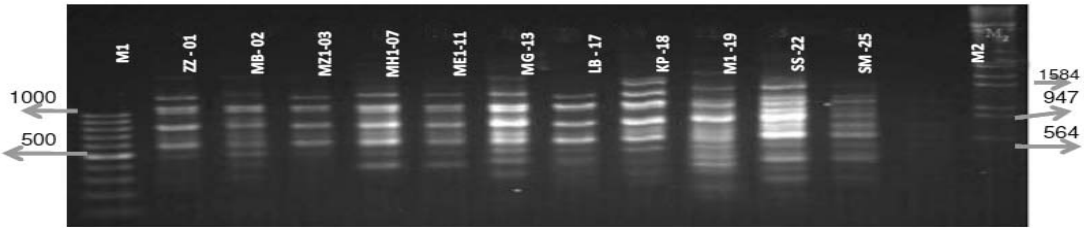
شکل ۵- الگوی باندهای محصولات PCR جدایه‌های قارچ *Macrophomina phaseolina* هضم شده با آنزیم برشی *Mbo* I (اعداد درج شده در بالای شکل، شماره جدایه‌های مورد بررسی و M_1 معرف نشانگر وزنی DNA 100bp و M_2. معرف نشانگر DNA، 1kbp).

در بررسی تنوع درون گونه‌ای قارچ *Macrophomina phaseolina* با استفاده از نشانگرRAPD، پنج آغازگر در مکان‌های تکثیر شده چندشکلی خوبی نشان دادند (شکل ۴ و ۵). کل قطعات تکثیر شده توسط این آغازگرها ۶۸ باند بود. نتیجه تجزیه خوشه‌ای با استفاده ازضریب تشابه جاکارد (Jaccard's coeffiicient) نشان داد که در سطح شباهت ۴۲ درصد تمام جدایه‌های مربوط به منطقه ورامین و اطراف از جدایه‌های گرگان متمایز شده و هر کدام گروه‌های جداگانه قرار گرفتند. در سطح شباهت ۷۰ درصد یک گروه دو عضوی، سه گروه سه عضوی و بقیه تک عضوی بودند. بیشترین عدم تشابه بین جفت جدایه‌های سویا از گرگان (SS-22) و جدایه خربزه زرد صادراتی از ملک زینل (ZZ- 01) وجود داشت. جدایه‌های سویا (SM-25 و SS-22) در سطح شباهت ۷۸ درصد با هم مشابه‌اند (شکل ۸).

در روش PCR-RFLP مقایسه الگوی برشی توسط



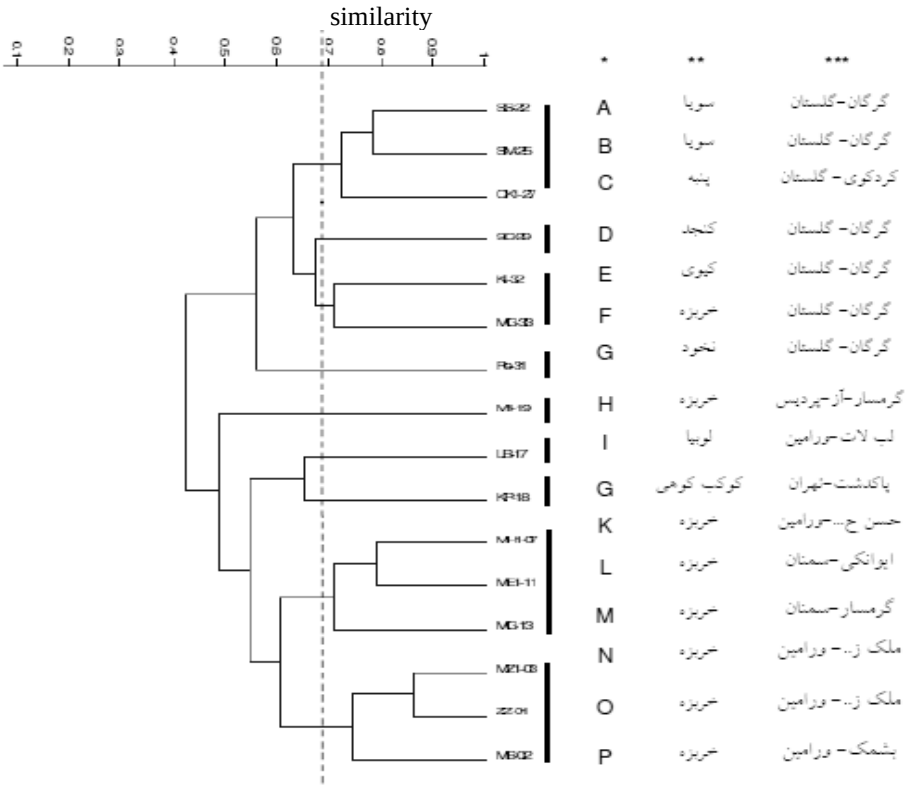
شکل ۶- الگوی باندهای حاصل از انگشت نگاری به روش RAPD با استفاده از آغازگر 10mer F (اعداد درج شده در بالای شکل، شماره جدایه‌های مورد بررسی و M1 معرف نشانگر وزنیDNA 100bp و M2. معرف نشانگر DNA، 1kbp)



شکل ۷- الگوی باندی حاصل از انگشت نگاری به روش RAPD با استفاده از آغازگر e3 ((اعداد درج شده در بالای شکل، شماره جدایه‌های مورد بررسی و M1 معرف نشانگر وزنیDNA 100bp و M_2. معرف نشانگر DNA، 1kbp).

آنزیم‌های برشی نشان داد که این روش برای تفکیک این جدایه‌های قارچ *M. phaseolina* بر اساس منشاء میزبانی و جغرافیای مناسب نمی‌باشد. این تحقیق پیشنهاد می‌کند که این جدایه‌ها بسیار به هم نزدیک بوده و نمی‌توان آنها را با روش PCR-RFLP از یکدیگر تفکیک کرد. این یافته‌ها با نتایج Su *et al.* (2001) مطابقت دارد. هرچند Purkayastha *et al.* (2005) در این نواحی تکثیر شده وجود چند شکلی را گزارش کردند و دلیل این تنوع را به علت پدیده پاراسکشوال و جهش مرتبط دانستند چون هیچ مرحله جنسی در چرخه زندگی قارچ *M. phaseolina* مشاهده نشده است، فرض شده که یک قارچ غیر جنسی بوده و میکرواسکلروت و کنیدی‌ها تنها عناصر قابل تکثیر تولید شده می‌باشد. در قارچهایی که تولید مثل جنسی دارند به دلیل درجه بالایی از نوترکیبی، تنوع ژنتیکی در آنها معمول است. در غیاب تولیدمثل جنسی در قارچ *M. phaseolina* تنوع ژنتیکی ممکن است در طی فرآیند نوترکیب‌های سوماتیکی مانند آمیزش سلول‌ها و یا نوترکیب‌های پاراسکشوال رخ می‌دهد (Carlile, 1986).

آنالیز RAPD نشان داد که جدایه‌های قارچ



شکل ۸- دندروگرام حاصل از تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصل از نشانگر RAPD و بررسی قرابت جدایه‌های قارچ *Macrophomina phaseolina* بر اساس ضریب تشابه جاکارد مجاسبه شده از داده‌های حاصل از تجزیه RAPD.
*گروههای ژنوتیپی ** میزبان جدایه‌ها

M. phaseolina به وضوح از یکدیگر تفکیک شدند و شکل دندروگرام، به وضوح، زیر گروه‌هایی براساس منشاء جغرافیایی و میزبان‌هایشان تعیین کرد. چندشکلی DNA جدایه‌های قارچ *M. phaseolina* از ده میزبان و مناطق مختلف که در این تحقیق استفاده شده است، نشان داد جدایه‌ها با هم ارتباط نزدیکی دارند، ولی تنوع ژنتیکی قابل بررسی نیز در بین جدایه بر اساس میزبان‌شان وجود دارد. تنوعی که در بین جدایه‌ها وجود دارد تا حدودی با تفاوت در منطقه جغرافیایی و میزبان‌هایشان مرتبط می‌باشد. در این مورد با سازگاری جدایه‌ها به میزبانشان در جمعیت‌هایی که فاقد تخصص میزبانی‌اند، و تحت فشار انتخاب یکسانی باشند، تشریح شود.

در مطالعه مقایسه شباهت ژنتیکی جدایه‌ها از میزبان‌های مختلف در تناوب با سویا و جدایه‌هایی که از مزارع تک‌کشتی تهیه شده بودند، تنوع بیشتری بین جدایه‌های مناطق تک‌کشتی مشاهده شد. از طرفی شباهت بین جدایه‌ها، این فرضیه که جدایه‌ها از اجداد مشابه مشتق شده باشند را تائید می‌کند ممکن است به دلیل انتقال جدایه‌ها با بذر، تجهیزات آلوده یا خاک آلوده به اسکلروت باشد (Alvaro *et al*., 2003). در سال ۲۰۰۳ تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های برزیلی قارچ *M. phaseolina* و نتایج گروه‌بندی‌ها نشان داد که تنوع ژنتیکی کمی بین جدایه‌های سویا که در یک گروه‌اند وجود دارد. بنابراین تنوع بین گروه‌ها بیشتر است. معمولاً، تنوع ژنتیکی کمی بین جمعیت‌های قارچ‌هایی که به روش غیرجنسی تولیدمثل می‌کنند، مانند جدایه‌های قارچ *M. phaseolina* وجود دارد. پاراسکشوال و یا آمیزش سلول‌های که دارای هیف‌های متفاوت، ممکن است سبب شکل‌گیری هتروکاریون شده و تنوع را ایجاد کنند. دلیل همدهانی هیفی کم، تفاوت‌های مورفولوژیک و بیماری‌زایی بین جدایه‌ها می‌تواند در برخی جدایه‌ها بر اساس منشاء جغرافیای به‌وجود آمده باشد. یعنی بین قدرت بیماری‌زایی و منشاء جغرافیایی جدایه‌ها ارتباط وجود دارد (Beas-Fernandez *et al*., 2006).

نتیجه‌گیری کلی

تنوع ژنتیکی جدایه‌ها تا حدودی تابعی از تنوع جغرافیایی بوده است، به طوری که جدایه‌های با مراکز پراکنش یکسان در گروه‌های ژنتیکی مجاور هم قرار گرفتند. می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرده که تنوع ژنتیکی جدایه‌های مربوط به مناطق مختلف با تنوع جغرافیایی آن‌ها مطابقت دارد و دلیل آن انتقال احتمالی ارقام از سایر مکان‌ها به این مناطق می‌باشد. به این ترتیب، این فرضیه تقویت می‌شود که ممکن است جدایه‌ها از یک والد مشترک منشا گرفته و سپس در نواحی مختلف ایران پراکنده شده باشند. و شاید طی یک دوره طولانی و بر اثر بروز جهش‌ها و عوامل محیطی با یکدیگر تفاوت‌های ظاهری یافته باشند، هرچند این تفاوت‌ها در حدی نیست که آنها را از نظر ژنتیکی از همدیگر دور نماید. جهت بررسی تنوع و تفاوت بیشتر در بین جدایه‌ها، استفاده از سایر روش‌های مولکولی و تحقیقات بیشتر، روی جدایه‌های سایر مناطق و میزبان‌های مختلف سودمند می‌باشد.

سپاسگزاری

از کلیه پرسنل پردیس ابوریحان دانشگاه تهران که در این راه ما را یاری کردند سپاسگزاریم. همچنین از جناب آقای مهندس صانعی و جناب آقای مهندس رضوی و خانم مهندس الهام اکراسردشتی از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به خاطر اهداء جدایه‌ها صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Almeida, A. M., Abdelnoor, R. V., Arias, C. A., Carvalho, V. P., Filho, D. S., Marin, S. R., Benato, L. C. & Pinto, M. C. (2003). Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 279-285**.**
2. Bagheri, A., Izadi, D. A. & Malboobi, M. A. (2002). *Practical Applications of Plant Molecular Biology*.
3. Ferdowsi University of Mashhad Publication. No.341. (In Farsi).
4. Beas-Fernandez1, R., DeSantiago, A., Hernandez-Delgado, N. & Mayek-Perez, S. (2006). Characterization of Mexican and non-Mexican characteristics, pathogenicity on bean seeds and

endoglucanase genes. *Plant Pathology*, 88, 53-60.
5. Bruns, T. D., White, T. J. & Taylor, J. W. (1991). Fungal molecular systematicis. *Ecology System*, 22, 525–564
6. Carlile, M. J. (1986). Genetic exchange and gene flow: Their promotion and prevention. In Rayner, A. D. M., Brasier., C. M., Moore, D. (Ed) , *Evolutionary Biological of the Fungi*. (pp. 203–214). Cambridge University Publishers.
7. Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Philips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. & Groenewald, J. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies Mycology*, 55, 235–253.
8. Darrell, H. S., Lynne, S., Connie, F. C. & Gibas, I. W. (2008). Disseminated fungal infection in a renal transplant recipient involving *Macrophomina phaseolina* and *Scytalidium dimidiatum*: case report and review of taxonomic changes among medically important members of the Botryosphaeriaceae. *Medical Mycology*, 46, 285_292.
9. Dhingra, O. D. & Sinclair, J. B. (1978). Biology and Pathology of *Macrophomina phaseolina.* In Dhingra, O.D., Sinclair, J. B. (Eds) Universidade Federal de Vicosa, Vicosa, Brazil.
10. Etebarian, H. R. (1983). *Vegetable diseaes and their control*. University of Tehran Press. P.142. (In Farsi).
11. Hammer. O., Harper. D. & Ryan. D. (2007). PAST: Palaeontological Statistics. Palaeontological community and diversity analysis. *Journal of Paleontology*, 53, 1213-1227.
12. Jana, T., Singh, N. K., Koundal, K. R. & Sharma, T. R. (2005). SSR-based detection of genetic variability in the charcoal root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *The British Mycological Society*, 109(1), 81–86.
13. Jimenez-Diaz, R. M., Blanco-Lopez, M. A. & Sackston, W. E. (1983). Incidence and distribution of charcoal rot of sunflower caused by *Macrophomina phaseolina* in Spain. *Plant Diseases*, 67, 1033–1036
14. Manici, L. M., Caputo, F. & Cerato, C. (1995). Temperature responses of isolates of *Macrophomina phaseolina* from different climate regions of sunflower production in Italy. *Plant Disease*, 79, 834-838.
15. Mayek-Perez, N., Garcia-Espinosa, R., Lopez-Castaneda, C., Acosta-Gallegos, J. A. & Simpson, J. (2002). Water relations, histopathology, and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiology and Molecular. Plant Pathology*, 60, 185–195.
16. McDonald, B. A. & Martines, J. P. (1990). Restriction fragment length polymorphism in *Septoria tritici* a hight frequency. *Current Genetics*, 17, 133-138.
17. Purkayastha, S. (2005). Race identification of *Macrophomina Phaseolina*, Causal agent of root rot of cluster bean using molecular markers. Ph. D. dissertation. Guru Jambheshwar University, Hisar, India.
18. Su, G., Suh, S. O., Schneider, R. W. & Russin, J. S. (2001). Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*, 91, 120-126.
19. Weiland, J. J. (2002). Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. USDA-ARS, Northern Crop Science Laboratory, Sugar beet and Potato Research Unit Fargo, N. D. 58105-5677.
20. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninskey, J.J. & White, T.J. (Eds.)
21. PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Publisher, *San Diego*. PP. 315–322.