

بررسی چندشکلی DNA بین گروه های سازگاری میسلیمی *Sclerotinia sclerotiorum* با نشانگر
ISSR

الهام کریمی¹، ناصر صفایی^{1*}، مسعود شمس بخش¹

¹ گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: 1389/02/12، تاریخ پذیرش: 1390/03/27

چکیده

به منظور ارزیابی ساختار ژنتیکی 38 جدایه قارچ *Sclerotinia sclerotiorum*، نماینده سی و هشت Mycelial Compatibility Groups (MCG)، جمع آوری شده از مزارع کلزای سه استان گلستان، مازندران و آذربایجان غربی از نشانگر ISSR استفاده شد. شش آغازگر ISSR، از میان 19 آغازگر آزمون شده توانستند 2124 باندها را تکثیر کنند که در محدوده 120 تا 3800 جفت باز قرار داشتند. آغازگرهای ISSR09، ISSR10 و P1 بیشترین قدرت تمایز و شاخص نشانگری را نسبت به دیگر آغازگرها داشتند که نشان دهنده کارایی بهتر این سه آغازگر در تفکیک جدایه ها از یکدیگر است. در این پژوهش، نشانگر ISSR توانست 38 جدایه را به 36 ژنوتیپ تفکیک کند و نشان داد که در جمعیت های *S. sclerotiorum* هر MCG به لحاظ ژنتیکی با بقیه MCG های تعیین شده تفاوت دارد.

واژه های کلیدی: *Sclerotinia sclerotiorum*، تنوع ژنتیکی، ISSR شاخص نشانگری، قدرت تمایز.

ریز ماهواره (Atallah *et al.*, 2004; Mert- Türk *et al.*, 2007; Sexton and Howlett, 2004; Carpenter *et al.*, 2006) و RFLP (Sexton *et al.*, 1999; Cubeta *et al.*, 1997; Ekins, *et al.*, 2005; Hambleton *et al.*, 2002; Kohn *et al.*, 1992), RAPD (Kohli *et al.*, 1992), (Sun *et al.*, 2005) و ISSR (Meinhardt *et al.*, 2002; Arbaoui *et al.*, 2008) برای بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت های *S. sclerotiorum* استفاده شده است. بررسی نواحی بین توالی های ساده تکراری (ISSR)¹ روشی است که به سرعت تنوع ژنتیکی میان جدایه های یک گونه را نشان می دهد. لذا، در پژوهش حاضر وجود تنوع ژنتیکی بین گروه های سازگاری میسلیمی *S. sclerotiorum* با استفاده از نشانگر مذکور مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جداسازی عامل بیماری و تعیین MCG

جدایه ها

در طی فصول زراعی 85-1384 و 86-1385 ضمن بازدید از مزارع کلزای استانهای گلستان، مازندران و آذربایجان غربی نمونه برداری صورت گرفت. در هر منطقه (علی آباد، هاشم آباد و کلاله) 10 مزرعه انتخاب و در هر مزرعه سی ساقه مشکوک به بیماری اسکروتینیایی، که دارای آثاری از قارچ شامل میسلیم سفید رنگ روی ساقه های آلوده و اسکروت داخل ساقه های ترک خورده بودند به

بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه کلزا، ناشی از *Sclerotinia (Lib.) de Bary sclerotiorum* باعث رسیدن پیش از موعد غلاف ها و ریزش بذور کلزا می شود که این امر منجر به ایجاد خسارت های زیادی بر روی این محصول می شود. این بیماری از استانهای گلستان، مازندران، گیلان و اردبیل گزارش شده است (Salati and Afshari Azad, 2003; Afshari azad and Ghegini, 2005). این بیماری به دلیل دامنه میزبانی گسترده قارچ مولد آن و دوام طولانی مدت اسکروت های آن در خاک به سختی قابل کنترل می باشد. یکی از مهمترین دلایل عدم موفقیت در مدیریت بیماری های گیاهی مربوط به ناقص بودن اطلاعات ما در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت های بیمارگر می باشد. در جمعیت هایی با تنوع ژنتیکی بالا احتمال وجود تنوع در قدرت بیماریزایی، تشکیل و جوانه زنی اسکروت ها و نیز عکس العمل جدایه ها نسبت به قارچ کش ها یا توانایی در مقاومت به عوامل بیوکنترل بسیار زیاد است. بنابراین، بالا بردن اطلاعات در این زمینه مسلماً در اتخاذ روش های موثر کنترل و تنظیم استراتژی های کنترل کارآمدتر نقش خواهد داشت (Tamietti and Valentino, 2001; Martin and English, 1997). انگشت نگاری DNA یکی از روش های مفید برای بررسی ژنتیک جمعیت های این قارچ می باشد (Kohn *et al.*, 1990, 1991). از نشانگرهای مولکولی

¹ Inter Simple Sequence Repeats

بررسی قرار گرفتند. هر آزمایش دو بار تکرار گردید.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از محلول نمکی DNA استفاده شد (Safaie *et al.*, 2005). پس از انجام عملیات استخراج، کیفیت DNA استحصالی به وسیله الکتروفورز و غلظت آن با اسپکتوفتومتر (Ependorfe, Germany) مورد سنجش قرار گرفت. در این روش دو میکرولیتر از DNA نمونه را با 198 میکرولیتر آب دیونیزه سترون در کووت ریخته و کاملاً مخلوط گردید. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج 260 و 280 و همچنین نسبت این دو قرائت شد. یک نمونه DNA خوب دارای نسبتی معادل 1/8 تا 2 می باشد. در پایان غلظت نهایی DNA با احتساب ضریب رقت به دست آمد.

انجام PCR و الکتروفورز

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های این بیمارگر تعداد 38 جدایه به عنوان نماینده هر MCG (داده‌های منتشر نشده) انتخاب گردید. برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز 19 آغازگر، که همگی ساخت شرکت سیناژن بودند روی 38 جدایه مورد استفاده قرار گرفت. تکثیر DNA در ترموسایکلر گرادیانته اپندورف در حجم نهایی 25 میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل 2/5 میکرولیتر بافر PCR (1X)، 0/2 میلی مولار (0/5 میکرولیتر) از هر یک از دزوکسی نوکلئوتیدها، 2 میلی مولار (1)

صورت تصادفی جمع آوری شد. جدایه‌های Q1, Q2, S-S 84, A11, S—S asli, A15, B110 از کلکسیون قارچ آزمایشگاه گروه بیماری شناسی دانشگاه تربیت مدرس بودند. به منظور جداسازی قارچ، اسکروت‌های موجود در ساقه‌های آلوده کلزا جدا و به مدت سه دقیقه در اتانول 70 درصد ضد عفونی سطحی شده و سپس با کاغذ صافی سترون خشک و اسکروت بر روی محیط عصاره سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) گذاشته شد. تشتک‌های پتری کشت شده به مدت پنج روز در دمای 25°C در انکوباتور نگهداری شدند. خالص سازی جدایه‌ها به روش نوک هیف روی محیط کشت آب آگار (water agar) انجام گرفت. به علت کثرت جدایه‌ها، از هر مزرعه 2-3 جدایه به صورت تصادفی انتخاب شد و در نهایت تعداد 64 جدایه بر اساس پراکنش جغرافیایی از شش منطقه برای تعیین MCG استفاده شد. آزمون‌های بررسی سازگاری میسلیمی به روش اسکافر و کوهن (Schafer and Kohn, 2006) انجام شدند. بدین ترتیب که دو دیسک به قطر دو میلی متر از حاشیه فعال پرگنه دو جدایه برداشته و به فاصله 3/5 سانتی متر از یکدیگر روی محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار، که به آن 175 میکرولیتر در لیتر رنگ قرمز ساخت شرکت McCormick اضافه شده بود قرار داده شدند، یک جفت در هر تشتک پتری، و در دمای دمای 22 °C و تاریکی نگه داری شدند. نمونه‌ها 4، 7 و 11 روز بعد از مقابل هم قرار دادن مورد

Vilber Lourmat ساخت شرکت Photo-capt در فرانسه و بر اساس اندازه باندهای نردبان ژنومی یک کیلو بازی برای تمام جدایه ها مشخص گشت. ژل ها بر اساس حضور (1) یا عدم حضور باند (0) امتیازدهی شدند و ماتریس داده ها تشکیل شد. بر اساس نتیجه ماتریس شباهت، که با استفاده از ضریب تشابه جاکارد به دست آمد تجزیه و تحلیل خوشه ای به کمک روش UPGMA در نرم افزار NTSYS-pc (Rohlf, 2000) انجام و دندروگرام مربوطه ترسیم شد. محتوای اطلاعات چند شکل (PIC)² با استفاده از جمع مربع فراوانی آلی (p) و جمع مربع فراوانی عدم وجود آلی (q) و حذف لوکوس منومورف از طریق رابطه

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n \frac{P_i^2}{n} + \sum_{i=2}^n \frac{q_i^2}{n} \right)$$

محاسبه شد (Chadha and Gopalakrishna, 2007). شاخص نشانگری (MI)³ نیز با استفاده از فرمول $MI = PIC \times EMR$ برای هر آغازگر محاسبه شد (Powell et al., 1996). در این رابطه EMR^4 نسبت چند گانه موثر می باشد که بیانگر تعداد جایگاه های ژنی چند شکل موجود در یک ژنوتیپ است و برحسب رابطه $EMR = n_p \times \beta$ محاسبه می شود. در این رابطه، n_p تعداد کل جایگاه های ژنی چند شکل و β از رابطه $\beta = n_p / (n_p + n_{np})$ به دست می آید. n_p تعداد باندهای چند شکل و n_{np} تعداد باندهای یک شکل می باشد (Powell et al., 1996).

میکرولیتسر) از کلرید منیزیم، 1 میکرومولار (ا میکرولیتسر) از آغازگر و 1/5 واحد (0/3 میکرولیتسر) از آنزیم Taq پلیمراز (CinnaGen, Tehran) انجام گرفت. تکثیر قطعات DNA با واسرشته سازی اولیه در دمای 95°C به مدت پنج دقیقه، تکرار 40 چرخه شامل 30 ثانیه واسرشته سازی در دمای 94°C یک دقیقه در دمای بهینه شده هر آغازگر برای اتصال مطابق جدول 1 و 30 ثانیه برای گسترش در دمای 72°C و گسترش نهایی به مدت شش دقیقه در دمای 72°C انجام شد (Weising et al., 1995). برای مشاهده محصولات PCR، پس از افزودن یک میکرولیتسر رنگ بارگذاری 16X¹ به محصول PCR، از هر نمونه 10 میکرولیتسر به چاهک های ژل آگارز 1/2 درصد اضافه شد و با ولتاژ ثابت 85 ولت به مدت سه ساعت در بافر با غلظت یک بار TBE شامل تریس-بورات-EDTA الکتروفورز (Pharmacia LKB.EPS 500/400, USA) رویت باند های حاصل پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید (یک میکروگرم در میلی لیتر) تحت نور UV توسط دستگاه فتوگرافی ساخت شرکت Vilber Lourmat مدل T-Ø 5×20- 2A صورت گرفت.

آنالیز داده ها

برای امتیازدهی باندها، نخست اندازه هر یک از باندهای DNA که به خوبی روی ژل قابل رویت بودند با استفاده از نرم افزار کامپیوتری

² Polymorphic Information Content

³ Marker Index

⁴ Effective Multiplex Ratio

¹ 6X loading dye

جدول 1- توالی، دمای اتصال، اندازه باندهای تکثیر شده، تعداد کل زیر گروه ها، تعداد زیر گروه های متشکل از یک جدایه، قدرت تمایز و شاخص نشانگری آغازگرهای استفاده شده برای 38 جدایه *Sclerotinia sclerotiorum* مورد مطالعه.

Table 1- Sequence, annealing temperature, size of amplified bands, number of types, number of types represented by a single isolate, discriminatory power and marker index of used primers for 38 studied isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*.

MI	D	n	N	اندازه باندهای تکثیر شده Size of amplified bands	دمای اتصال (°C) Annealing temperature	توالی Sequence	آغازگر Primer
5.57	0.99	26	32	140-3600 bp	56.5	5'-CCACCACCACCACCA-3'	ISSR09
6.80	0.97	24	28	120-2600 bp	57.5	5'-CACCACCACCACCAC-3'	ISSR10
5.64	0.98	23	29	270-3800 bp	53.5	5'-TCTCTCTCTCTCTCC-3'	P1
2.29	0.79	8	14	450-1900 bp	52	5'-ATGATGATGATGATGATG-3'	P4
5.22	0.94	12	19	320-3200 bp	52	5'-GACAGACAGACAGACATA-3'	LMB-A
2.54	0.79	9	13	800-3400 bp	56	5'-CAGCAGCAGCAGCAG-3'	Stag3

N: تعداد کل زیر گروه ها؛ n: تعداد زیر گروه های متشکل از یک جدایه؛ D: قدرت تمایز؛ MI: شاخص نشانگری

N: number of types; n: number of types represented by a single isolate; D: discriminatory power; MI: marker index

نتایج

جداسازی عامل بیماری و تعیین MCG جدایه ها

از مجموع 300 ساقه کلزای دارای علائم بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی تعداد 205 جدایه *S. sclerotiorum*، خالص سازی گردید که از این تعداد، 64 جدایه از شش منطقه جغرافیایی جهت بررسی سازگاری میسلیمی انتخاب شدند (جدول 2). در بین این تعداد سی و هشت MCG شناسایی شد (داده های منتشر نشده). قطعات DNA تکثیر شده توسط شش آغازگر ISSR09، ISSR10، P1، P4، LMB-A و Stag3 از میان 19 آغازگر آزمون شده تکرارپذیر و چند شکل بودند (شکل 1) و در نتیجه این شش آغازگر برای کلیه

به منظور ارزیابی توانایی نشانگر مولکولی استفاده شده در تمایز بین جدایه ها شاخص تنوع سیمپسون از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$D = 1 - \left\{ \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S X_j(X_j-1) \right\}$$

در این رابطه N تعداد کل جدایه ها در جمعیت و X_j تعداد جدایه های قرار گرفته در گروه jام می باشد (Simpson, 1949). تعداد آلل ها (Na)، تعداد آلل های موثر (Ne)، تنوع ژنی نئی (H) و شاخص تنوع شانون (I) با استفاده از نرم افزار POPGENE 1.31 محاسبه شد (Yeh et al., 1997).

جدایه ها استفاده شدند. سایر آغازگرها یا قادر به تولید محصول نبودند یا باندهای یک شکل تولید می کردند. بهترین دمای اتصال به دست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول 1 آورده شده است. این شش آغازگر در مجموع توانستند 2124 باند را شناسایی کنند که 2048 باند چند شکل بودند. آغازگر ISSR09 بیشترین تعداد باند و آغازگر Stag3 کمترین تعداد باند را تکثیر نمودند. آغازگرهای ISSR09، ISSR10 و P1 بیشترین قدرت تمایز و شاخص نشانگری را نسبت به دیگر آغازگرها داشتند که نشان دهنده کارایی بهتر این آغازگرها در تفکیک جدایه ها از یکدیگر است. آغازگرهایی که در این مطالعه مقدار MI بالاتری را به خود اختصاص دادند، می توانند برای مطالعه جدایه های ایرانی *S. sclerotiorum* در سطح وسیع با استفاده از نشانگر ISSR استفاده شوند. اطلاعات حاصل از آغازگرهای مورد استفاده در نشانگر ISSR در جدول 1 خلاصه شده است. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل الگوهای باندهای حاصل از مجموع شش آغازگر ISSR در سطح تشابه 56 درصد جدایه ها را به چهار گروه تقسیم نمود، پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نیز بیانگر این مطلب می باشد (شکل 2). گروه اول 89/5 درصد

جدایه ها را در بر گرفت که شامل جدایه هایی از علی آباد، کلاله، همه جدایه های هاشم آباد، جدایه ارومیه، جدایه گرگان و جدایه قائم شهر بود. در گروه دوم، سوم و چهارم به ترتیب یک جدایه کلاله، دو جدایه از کلاله و یک جدایه از کلاله جای گرفتند. جدایه ها در سطح تشابه 80 درصد به 20 گروه تقسیم شدند. نتایج حاصل از تلفیق داده های ISSR نتوانست جدایه ها را از لحاظ منشاء جغرافیایی و گروه های سازگاری میسلومی آنها تفکیک کند. تنوع ژنتیکی سه جمعیت *S. sclerotiorum* متعلق به مناطق علی آباد، هاشم آباد و کلاله با استفاده از تنوع ژنی نئی و شاخص تنوع شانون محاسبه شد (جدول 3). درصد جایگاه های ژنی پلی مورف (PPL)، تعداد آلل ها (Na) و تعداد آلل های موثر (Ne) برای سه جمعیت متفاوت بود. نتایج نشان داد که جمعیت متعلق به کلاله بیشترین تنوع ژنتیکی را داشت (I= 0/53؛ H= 0/37؛ PPL= 93/23%). ترتیب تنوع ژنتیکی بر اساس تنوع ژنی نئی و شاخص تنوع شانون به صورت: کلاله < علی آباد < هاشم آباد می باشد. تنوع ژنتیکی بر اساس درصد جایگاه های ژنی پلی مورف از 27/07% تا 93/23% بین سه جمعیت متغیر بود که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالاست.

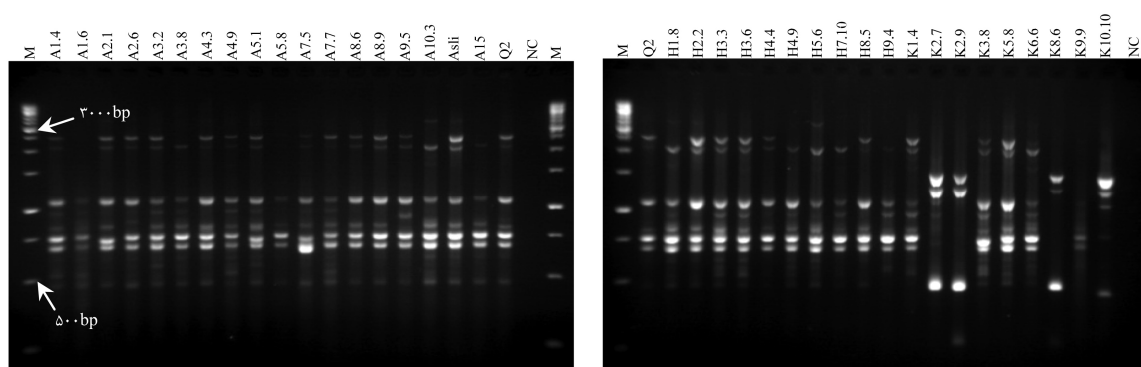
جدول 2- مشخصات جدایه های *Sclerotinia sclerotiorum* بر اساس نام جدایه، محل جمع آوری و MCG.

Table 2- *Sclerotinia sclerotiorum* isolates grouped by name of isolates, location and MCG

گروه سازگاری میسلیومی Mycelial compatibility grouping	محل جمع آوری Location	نام جدایه Name of isolate	گروه سازگاری میسلیومی Mycelial compatibility grouping	محل جمع آوری Location	نام جدایه Name of isolate
21	Golestan (Ali Abad)	A7.5	1	Golestan (Hashem abad)	H1.4
22	Golestan (Ali Abad)	A7.7	1	Golestan (Hashem abad)	H1.8
23	Golestan (Ali Abad)	A8.6	1	Golestan (Hashem abad)	H1.9
24	Golestan (Ali Abad)	A8.9	2	Golestan (Hashem abad)	H2.2
25	Golestan (Ali Abad)	A9.5	2	Golestan (Hashem abad)	H2.3
26	Golestan (Ali Abad)	A9.8	3	Golestan (Hashem abad)	H2.5
26	Golestan (Ali Abad)	A10.3	3	Golestan (Hashem abad)	H3.3
27	Golestan (Kalaleh)	K1.4	4	Golestan (Hashem abad)	H3.5
27	Golestan (Kalaleh)	K1.11	4	Golestan (Hashem abad)	H3.6
28	Golestan (Kalaleh)	K2.5	5	Golestan (Hashem abad)	H3.8
29	Golestan (Kalaleh)	K2.6	5	Golestan (Hashem abad)	H4.4
29	Golestan (Kalaleh)	K2.7	6	Golestan (Hashem abad)	H4.6
28	Golestan (Kalaleh)	K2.9	6	Golestan (Hashem abad)	H4.9
30	Golestan (Kalaleh)	K3.8	7	Golestan (Hashem abad)	H5.6
30	Golestan (Kalaleh)	K3.9	7	Golestan (Hashem abad)	H5.7
31	Golestan (Kalaleh)	K4.7	8	Golestan (Hashem abad)	H6.7
32	Golestan (Kalaleh)	K5.6	8	Golestan (Hashem abad)	H7.10
32	Golestan (Kalaleh)	K5.8	9	Golestan (Hashem abad)	H8.5
31	Golestan (Kalaleh)	K6.6	9	Golestan (Hashem abad)	H8.9
33	Golestan (Kalaleh)	K8.6	10	Golestan (Hashem abad)	H8.10
33	Golestan (Kalaleh)	K9.1	10	Golestan (Hashem abad)	H9.3
34	Golestan (Kalaleh)	K9.2	10	Golestan (Hashem abad)	H9.4
34	Golestan (Kalaleh)	K9.9	11	Golestan (Ali Abad)	A1.4
35	Golestan (Kalaleh)	K10.1	12	Golestan (Ali Abad)	A1.6
35	Golestan (Kalaleh)	K10.10	13	Golestan (Ali Abad)	A2.1
36	Golestan (Gorgan)	S-S Asli*	14	Golestan (Ali Abad)	A2.6
36	Golestan (Gorgan)	S-S 84*	15	Golestan (Ali Abad)	A3.2
37	Mazandaran (Ghaem Shahr)	A11*	16	Golestan (Ali Abad)	A3.8
37	Mazandaran (Ghaem Shahr)	A15*	17	Golestan (Ali Abad)	A4.3
37	Mazandaran (Ghaem Shahr)	B110*	18	Golestan (Ali Abad)	A4.9
38	Western Azarbaijan (Urmieh)	Q1	19	Golestan (Ali Abad)	A5.1
38	Western Azarbaijan (Urmieh)	Q2	20	Golestan (Ali Abad)	A5.8

* این جدایه ها در فصول زراعی 85-1384 و بقیه جدایه ها در فصول زراعی 86-1385 جمع آوری شده اند.

* These isolates were collected in 2005 and the others in 2006.



شکل 1- الگوی DNA تکثیر شده در 38 جدایه منتخب *Sclerotinia sclerotiorum* با استفاده از آغازگر P1. M: نشانگر اندازه یک کیلو بازی، NC: کنترل منفی.

Figure 1- DNA fingerprinting of 38 selected isolates of *S. sclerotiorum* using P1 primer. M: DNA ladder 1kb (Fermentase), NC: Negative Control

جدول 3- اندازه جمعیت، جایگاه های ژنی پلی مورف، درصد جایگاه های ژنی پلی مورف، تعداد آلل ها، تعداد آلل های موثر، تنوع ژنی نئی و شاخص تنوع شانون سه جمعیت *Sclerotinia sclerotiorum* متعلق به علی آباد، هاشم آباد و کلاله.

Table 3- Sample size, polymorphic loci, percentage of polymorphic loci, number of alleles, number of effective alleles, Nei's gene diversity and Shannon's information index of three populations of *Sclerotinia sclerotiorum* belong to Ali Abad, Hashem Abad and Kalaleh.

<i>I</i>	<i>H</i>	<i>Ne</i>	<i>Na</i>	<i>PPL</i>	<i>PL</i>	اندازه جمعیت Population size	جمعیت Population
0.22	0.14	1.22	1.49	49.62	66	16	علی آباد (Ali Abad)
0.13	0.08	1.14	1.27	27.07	36	10	هاشم آباد (Hashem Abad)
0.53	0.37	1.65	1.93	93.23	124	9	کلاله (Kalaleh)
0.29	0.19	1.33	1.56	56.64	75.33	11.66	میانگین (Average)
0.37	0.23	1.33	1.98	98.50	131	35	کل (Total)
0.16	0.12	0.24	0.12				<i>SD</i>

PL: جایگاه های ژنی پلی مورف؛ *PPL*: درصد جایگاه های ژنی پلی مورف؛ *Na*: تعداد آلل ها؛ *Ne*: تعداد آلل های موثر؛ *H*: تنوع ژنی نئی؛ *I*: شاخص تنوع شانون؛ *SD*: انحراف معیار.

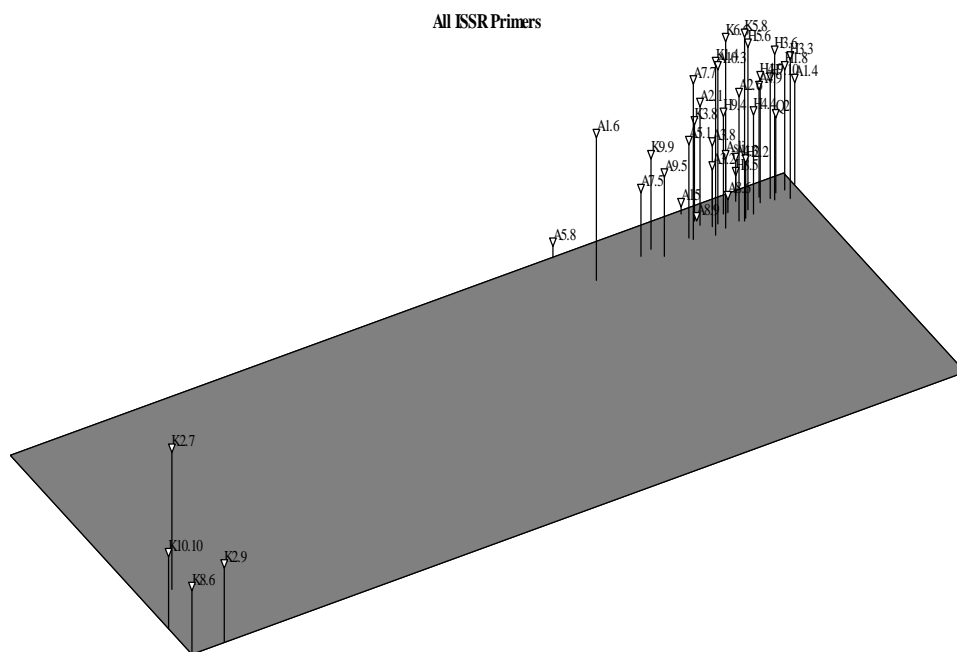
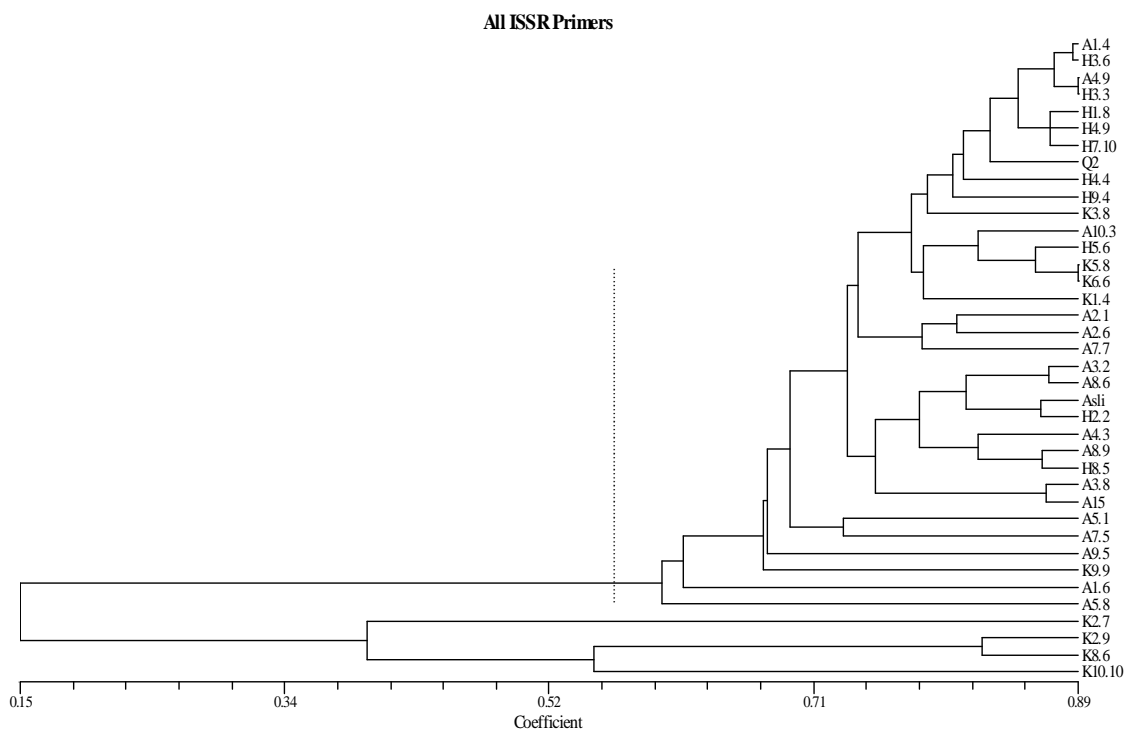
نرم افزار (NTSYS (Ver. 2.02) انجام گرفت. همان طور که انتظار می رفت مولفه اول بیشترین تغییرات را (در حدود 66/22 درصد) نسبت به سایر مولفه ها توجیه می کند و دوازده مولفه اول 90 درصد تغییرات را توجیه می کنند. این تبیین حاکی از عدم همبستگی بین نشانگرهای ISSR می باشد. مفهوم ژنومی این عدم همبستگی، پراکنده بودن (توزیع یکنواخت) فواصل قابل تکثیر بین جایگاه های ریز ماهواره در سراسر ژنوم می باشد.

فاصله ژنتیکی بین جدایه های مورد استفاده (0/02 تا 0/13) بسیار کم بود و شباهت ژنتیکی (0/87 تا 0/98) بسیار زیاد بود (جدول 4). شباهت ژنتیکی بین جمعیت های هاشم آباد و علی آباد بسیار زیاد بود و این نشان می دهد که جمعیت های این دو منطقه بسیار شبیه به همدیگر هستند. همچنین، نتایج نشان داد که جمعیت متعلق به منطقه کلاله متفاوت از جمعیت های هاشم آباد و علی آباد است. تجزیه به مختصات اصلی بر اساس ماتریس تشابه به دست آمده از ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از

جدول 4- اندازه های همسانی ژنتیکی و فاصله ژنتیکی نااریب نئی. شباهت ژنتیکی نئی (بالای قطر جدول) و فاصله ژنتیکی (پایین قطر جدول).

Table 4- Nei's unbiased measures of genetic identity and genetic distance. Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

کلاله	هاشم آباد	علی آباد	جمعیت (Population)
Kalaleh	Hashem Abad	Ali Abad	
0.87	0.98	-	علی آباد (Ali Abad)
0.88	-	0.02	هاشم آباد (Hashem Abad)
-	0.12	0.13	کلاله (Kalaleh)



شکل 2- دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای 38 جدایه منتخب *Sclerotinia sclerotiorum* حاصل از تلفیق داده های الگوی بندی ISSR و پلات سه بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی به روش ماتریس تشابه Jaccard.

Figure 2- Dendrogram depicting genetic diversity of 38 selected isolates of *S. sclerotiorum* resulting from combination of banding pattern of four rep-PCR primers, using UPGMA method and Jaccard's coefficient and three-dimensional plot.

بحث

آسکوسپورها روی داده باشد که ممکن است با جابجایی اسکروت ها از طریق ادوات کشاورزی تسهیل شده باشد. تنوع ژنی نئی و شاخص تنوع شانون جدایه های متعلق به کلاله در مقایسه با دیگر مناطق بالا بود. این امر نشان می دهد که جدایه های متعلق به کلاله چندشکلی بیشتری نسبت به جدایه های متعلق به دو منطقه دیگر نشان می دهند. بنابراین، پتانسیل ظهور جدایه هایی با توان بیماریزایی بالاتر روی واریته های مختلف کلزا و نیز مقاوم به قارچ کش در منطقه کلاله زیاد است. از طرف دیگر، با توجه به تنوع ژنتیکی بالای بیمارگر در کلاله، می توان آزمون های مزرعه ای بررسی مقاومت ارقام به این بیماری را در این ناحیه انجام داد. همچنین می توان بررسی های برهمکنش رقم-جدایه را با استفاده از جدایه های این منطقه انجام داد. نتایج تجزیه خوشه ای نشان داد که جدایه های K2.7، K2.9، K8.6 و K10.10 متعلق به کلاله (44/45% جدایه های کلاله) خودشان به تنهایی چهار کلاستر را تشکیل می دهند و از سایر جدایه های این منطقه و مناطق دیگر تفکیک شده اند، این امر بیانگر این مطلب است که احتمالاً در این منطقه ژنوتیپ های جدیدی در حال تکامل هستند (Hambleton *et al.*, 2002). پیدایش ژنوتیپ های جدید می تواند یک فرایند تکاملی مرتبط با منطقه جغرافیایی باشد (Carbone and Kohn, 2001)، همچنین می تواند ناشی از گسترش کشت کلزا و وجود

در این مطالعه برای اولین بار در ایران تنوع ژنتیکی جدایه های *S. sclerotiorum* جدا شده از کلزا با MCG مشخص توسط نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. نشانگر ISSR توانست 38 جدایه *S. sclerotiorum* که هر کدام نماینده یک MCG بودند به 36 ژنوتیپ تفکیک کند و نشان داد که گروه های سازگاری میسلیمی نماینده افرادی هستند که از نظر ژنتیکی متفاوتند و هر MCG به لحاظ ژنتیکی با بقیه MCG های تعیین شده تفاوت دارد (Kohn *et al.*, 1990). در این مطالعه با استفاده از نشانگر ISSR نشان داده شد که توالی هایی مشابه توالی های تکراری (TC)⁸، (ATG)⁶، (GACA)⁴، (CAC)⁵، (CCA)⁵ و (CAG)⁵ در ژنوم *S. sclerotiorum* وجود دارند. عدم تکثیر با آغازگرهایی مانند (GTG)⁵، (TGTC)⁴، (CAGC)⁴ شاید به این دلیل باشد که نقاط مکمل آنها در ژنوم این قارچ کمتر وجود دارند (Meyer *et al.*, 1992) و یا این که فاصله بین دو مکان اتصال آنها در DNA قارچ *S. sclerotiorum* آن قدر زیاد است که به آنها اجازه تکثیر موفق در PCR داده نمی شود. شباهت ژنتیکی بالا بین جمعیت های علی آباد و هاشم آباد نشان دهنده جریان ژنی می باشد. همچنین، نشان می دهد که این جمعیت ها ممکن است از یک جد مشترک منشا گرفته باشند. این جریان ژنی ممکن است از طریق مکانیسم های پراکنش طبیعی مانند

مشاهده شده در بین جدایه های *S. sclerotiorum* مورد بررسی می تواند در اثر مهاجرت، جهش و انتخاب تنوع گرا ایجاد شده باشد. وجود پدیده انتخاب تنوع گرا در جمعیت ها باعث انتخاب ژنوتیپ های مختلف در شرایط محیطی متفاوت می شود. در جمعیت هایی که در معرض شرایط محیطی متغیر هستند، وجود همزمان چندین ژنوتیپ نسبت به یک جمعیت کلونال یا همگون مطلوب تر است. جمعیت های *S. sclerotiorum* در مزرعه تحت تاثیر شرایط محیطی متغیر هستند چرا که تاریخچه کشت، واریته های میزبان، شرایط اقلیمی ماکرو و میکرو و عملیات کشاورزی همه باعث ایجاد یک محیط متغیر می شوند (Kohli et al., 1992) و لذا به نظر می رسد که جمعیت های این بیمارگر در مزرعه به صورت ناهمگون هستند که نتایج این مطالعه موید این مطلب است. همچنین، تنوع ژنتیکی بالای مشاهده شده می تواند ناشی از تولید مثل جنسی باشد، چرا که اینوکلوم اولیه برای ایجاد بیماری بر روی کلزا توسط این بیمارگر آسکوسپور است. اگرچه این گونه یک آسکومیسست هموتالیک است ولی پتانسیل دگرگشتی را دارد (Kohn et al., 1991; Atallah et al., 2004). مکانیسم دگرگشتی در این گونه هنوز مشخص نشده است، ولی این احتمال وجود دارد که میکروکنیدی های ایجاد شده توسط این بیمارگر که قابلیت جوانه زنی ندارند (Kohn, 1979) همانند اسپرماتیا عمل کنند (Atallah et al., 2004). نتایج بررسی با استفاده از این نشانگر

میزبان های دیگر این بیمارگر (Aghajani and Safaei, 2008) در مناطق مورد مطالعه باشد، با این وجود در تحقیق حاضر مطالعه ای روی این دو احتمال صورت نگرفت. جدایه ها در سطح تشابه 80 درصد به 20 گروه تقسیم شدند که نشان دهنده وجود تنوع بالا بین MCG های شناسایی شده می باشد. وجود تنوع ژنتیکی بالا با استفاده از نشانگر ISSR در قارچ های بیمارگر گیاهی توسط محققین مختلفی گزارش شده است. در برزیل Meinhardt et al. (2002) و همچنین Arbaoui et al. (2008) با استفاده از ISSR نشان دادند که تنوع ژنتیکی بالایی بین جدایه های *S. sclerotiorum* وجود دارد. پس از جمع آوری جدایه های *Fusarium oxysporum fsp.melongenae* از مزارع بادمجان در جنوب غربی ترکیه Baysal et al. (2010) با بررسی ژنتیک این جدایه ها با استفاده از نشانگر ISSR گزارش نمودند که بین جدایه های این بیمارگر تنوع ژنتیکی وجود دارد. همچنین، نتایج تحقیق دیگری توسط Bayraktar and Dolar (2010) با استفاده از نشانگر ISSR حاکی از وجود سطح بالایی از تنوع ژنتیکی بین و درون گونه های فوزاریوم مرتبط با بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه پیاز متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف ترکیه بود. مطالعات Dinolfo et al. (2010) نیز روی جدایه های *Fusarium poa* جدا شده از گندم در مناطق مختلف آرژانتین و انگلیس با استفاده از نشانگر ISSR، تنوع ژنتیکی بالایی را بین جدایه ها آشکار کرد. تنوع ژنتیکی بالای

جمعیت ها و تبادل ژنتیکی فراوان تفکیک و تمایز محدود به یک منطقه را کاهش می دهد (Wright, 1931; Slatkin, 1987). با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق می توان از نشانگر ISSR به عنوان یک تکنیک مفید و ساده برای بررسی تنوع ژنتیکی، مطالعات اپیدمیولوژی و فیلوژنتیکی *S. sclerotiorum* استفاده نمود.

نتوانست جدایه ها را بر مبنای نواحی جغرافیایی آنها از یکدیگر تفکیک کند. عدم ارتباط بین جدایه و منشاء جغرافیایی می تواند ناشی از غلبه جریان ژنی بر تاثیرات رانش ژنتیکی و جلوگیری از تفکیک و تمایز محدود به یک منطقه بین جمعیت ها باشد. به عبارتی دیگر، مهاجرت جدایه ها و اختلاط مداوم ژنوتیپ ها بین زیر

منابع

- Afshari Aazad, H. and Chegini, M. R. 2005. Management of *Sclerotinia* stem rot of canola. Plant Protection Institute of Iran. 34 p. (In Farsi).
- Aghajani MA, Safaie N (2008). New host for *sclerotinia* stem rot of canola. Journal of Phytopathology. 90: 147.
- Arbaoui M, Kaicr J, Huszar J (2008). Genetic variation of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from different conditions. Agriculture (Poľnohospodárstvo) 54: 36-39.
- Atallah ZK, Laget B, Chen X, Johnson DA (2004). High genetic diversity, phenotypic uniformity and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia Basin of Washington State. Phytopathology. 94: 737-742.
- Bayraktar H and Dolar FS (2010). Molecular Identification and Genetic Diversity of *Fusarium* species Associated with Onion Fields in Turkey. Journal of Phytopathology. 1-7.
- Baysal Ö, Siragusa M, Gümrukcu E, Zengin S, Carimi F, Sajeva M, Jaime A (2010). Molecular Characterization of *Fusarium oxysporum* fsp. *melongenae* by ISSR and RAPD Markers on Eggplant. Biochemical Genetics. 48:524-537.
- Carbone I, Kohn LM (2001). A microbial population species interface nested cladistic and coalescent inference with multilocus data. Molecular Ecology. 10: 947-967.
- Carpenter MA, Frampton C, Stewart A (1999). Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. New Zealand Journal of Crop Horticultural Science. 27: 13-21.
- Chadha S, Gopalakaishna T (2007). Comparative assessment of REMP and ISSR marker assays for genetic polymorphism studies in *Magnaporthe grisea*. Current Science. 93: 688-692.
- Cubeta MA, Codey BR, Kohli Y, Kohn LM (1997). Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in Eastern North Carolina. Phytopathology. 87: 1000-1004.
- Dinolfo MI, Stenglein SA, MorenoMV, Nicholson P, Jennings P, Salerno GL (2010). ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. European Journal of Plant Pathology. 127:483-491.
- Ekins MG, Aitken EAB, Goulter KC (2005). Identification of *Sclerotinia* species. Australian Plant Pathology. 34: 549-555.
- Hambleton S, Walker C Kohn LM (2002). Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999-2000 samples from Ontario and Quebec soybean. Canadian Journal of Plant Pathology. 24: 309-315.
- Kohli Y, Monail RAA, Anderson JB, Kohn LM (1992). Local and trans-Canadian clonal distribution of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola. Phytopathology. 82: 875-880.

- Kohn LM (1979). A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. *Mycotaxon*. 9:365-344.
- Kohn LM, Carbone I, Anderson JB (1990). Mycelial interaction in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Experimental Mycology*. 14: 255-267.
- Kohn LM, Stasovski E, Carbone I, Royer J, Anderson JB (1991). Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*. 81: 480-485.
- Martin FN, English JT (1997) Population genetics of soil borne fungal plant pathogens. *Phytopathology*. 87: 446-447.
- Meinhardt LW, Wulff NA, Bellato CM, Tsai SM (2002). Telomer and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* from Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. 27: 211-215.
- Mert-Türk F, Ipek M, Mermer D, Nicholson P (2007). Microsatellite and morphological markers reveal genetic variation within of population of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed rape in the Canakkale province of Turkey. *Phytopathology*. 155: 182-187.
- Meyer W, Lieckfeldt E, Wöstmeyer J, Börner T (1992). DNA fingerprinting for differentiating aggressivity groups of the rape seed pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Mycological Research*. 96: 651-57
- Powell W, Morgante M, Andre C, Vgel J, Tingey S, Rafalski A (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*. 2: 225-238.
- Rohlf FJ (2000). NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. Setauket, NY, USA, Exeter Biological Software.
- Safaie, N., Alizadeh, A., Rahimian, H. and Adam, G. A. 2005. Molecular characterization and genetic diversity among Iranian populations of *Fusarium graminearum*, the causal agent of wheat head blight. *Iranian Journal of Plant Pathology* 41:171-189 (In Farsi).
- Salati, M. and Afshari Aazad, H. 2003. Identification of canola pathogens in Golestan province. *Proceeding of the 15th Iranian Plant Protection Congress, University of Tehran, Karaj, Iran, p. 51 (In Farsi).*
- Schafer RS, Kohn LM (2006). An optimized method for mycelial compatibility testing in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*. 98: 593-597.
- Sexton AC, Howlett BJ (2004). Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. *Current Genetic*. 46: 357-365.
- Sexton AC, Whitten AR, Hawlett BJ (2006). Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in an Australian canola field at flowering and stem-infected stages of the disease cycle. *Genome*. 49: 1408-1415.
- Simpson EH (1949). Measurement of diversity. *Nature (London)* 163: 688.
- Slatkin M (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*. 236: 787-792.
- Tamietti G, Valentino D (2001). Physiological characterization of a population of *Phytophthora capsici* Leon. from northern Italy. *Plant Pathology*. 83: 199-204.
- Weising K, Atkinson RG, Gardner RC (1995). Genome fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *PCR Methods and Applications*. 4: 249-55
- Wright S (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*. 16: 97-159.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX (1997). POPGENE V 1.31 (on-line). <http://www.ualberta.ca/~fyeh>.

DNA polymorphism among mycelial compatibility groups of *Sclerotinia sclerotiorum* using ISSR marker

Karimi E.¹, Safaie N.*¹, Shamsbakhsh M.¹

¹ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

ABSTRACT

To assess the genetic structure of 38 *Sclerotinia sclerotiorum* isolates, representing 38 MCGs (Mycelial Comatability Groups), collected from canola fields in Golestan, Mazandaran and Western Azarbaijan provinces, ISSR marker were used. Six out of 19 ISSR primers were reproducible and could amplify 2124 bands ranging in size from approximately 120 bp to 3800 bp. ISSR09, ISSr10 and P1 primers had discriminatory power and marker index more than the others, indicating the efficiency of these three primers in discriminating of isolates. ISSR markers could differentiate 38 isolates into 36 genotypes, suggesting in *S. sclerotiorum* populations each MCG is genetically different from others.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*, genetic diversity, ISSR, marker index, discriminatory power

*Corresponding Author: Safaie N.

Tel: 02148292288

Email: nsafaie@modares.ac.ir