ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱
صفحه ۲۸۴-۲۷۷

# بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pythium aphanidermatum* Fitzp عامل مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندرقند با استفاده از نشانگر تکثیر بین توالی تکراری ساده(ISSR)

معصومه امینی[۱]، ناصر صفایی*[۲]، سید باقر محمودی[۳]

۱و۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

۳- استادیار موسسه تحقیقات چغندرقند

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:Nsafaie@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۲۴- تاریخ پذیرش:۹۱/۳/۲۳ )

## چکیده

**بیماری پوسیدگی ریشه چغندرقند ناشی از قارچ *Pythium aphanidermatum* Fitzp، یکی از مهمترین بیماری‌های چغندرقند در ایران می‌باشد. جهت بررسی تنوع ژنتیکی عامل این بیماری، از مزارع چغندرکاری هشت استان کشور به تعداد ۱۰ تا ۲۰ نمونه از هر مزرعه، نمونه‌برداری شد. جدایه‌ها پس از خالص‌سازی، براساس خصوصیات ریخت‌شناسی اندام‌های رویشی و زایشی، شناسایی و ۱۹ جدایه برای بررسی تنوع ژنتیکی انتخاب شدند. مطالعات مولکولی جدایه‌ها براساس نشانگر ISSR و با هشت آغازگر انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه تحلیل خوشه‌ای آغازگرها بر اساس روش UPGMA و ضریب جاکارد، در سطح تشابه ۶۴ درصد جدایه‌ها را به پنج گروه تقسیم کرد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل سرعت رشد جدایه‌ها در دو دمای ۲۶±۲ °C و ۲۹±۲ °C، توسط نرم افزار MSTATC و MVSP، جدایه‌ها را به دو گروه تند رشد و کند رشد تقسیم کرد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مولکولی و مورفولوژیکی نشان داد که جدایه‌های متعلق به این هشت ناحیه جغرافیایی، دارای قرابت ژنتیکی بوده و لزوماً ارتباطی بین سرعت رشد جدایه‌ها و پراکنش جغرافیایی آنها وجود ندارد.**

**واژه‌های کلیدی**

**پوسیدگی ریشه چغندرقند،**
**تنوع ژنتیکی،**
**صفات مورفولوژیکی،**
**نشانگر ISSR،**
***Pythium aphanidermatum* Fitzp**

## مقدمه

یکی از مهمترین عوامل کاهش عملکرد چغندرقند پوسیدگی پی‌تیومی ریشه چغندرقند می‌باشد. جنس *Pythium*، پاتوژن بذور، گیاهچه‌ها و بافت‌های گیاهی نابالغ می‌باشد. همچنین تعدادی از گونه‌های این جنس به بافت‌های گیاهی بالغ حمله کرده و در آنها باعث بیماری می‌شوند. بیماری پوسیدگی پی‌تیومی ریشه ایجاد شده توسط *Pythium aphanidermatum* Fitzp در ایالت‌های آریزونا، کالیفرنیا، کلرادو، تگزاس، کانادا، استرالیا و ایران گزارش شده است و پوسیدگی پی‌تیومی ریشه ایجاد شده توسط *P.deliense* Meurs نیز با علائم متفاوتی در آریزونا و تگزاس گزارش شده‌است(Rush 1987). شناسایی دقیق گونه‌ها و جمعیت‌های درون گونه‌ای بیمارگرها، اولین گام جهت کنترل موثر آنها می‌باشد. به دلیل عدم وجود صفات مورفولوژیکی تشخیصی و تغییرپذیری ساختارهای مورفولوژیکی در جنس *Pythium* همانند دیگر جنس‌های Oomycetes، استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی در شناسایی اعضای داخل

[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.9.8 ]

گونه ها بسیار مشکل است (Levesque and de Cock 2004; Martin 2000). استفاده از تکنیک‌های مولکولی می‌تواند به حل این مشکل کمک کند. از جمله تکنیک‌های مولکولی که جهت شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. aphanidermatum* استفاده شده عبارتند از: RFLP، ALP، RAPD، AFLP، SSR، ISSR، SCAR، ITS، PCR-RFLP (Chen, 1992; Francis et al. 1994; Herrero and Klemsdal 1998; Kageyama et al. 1998; Matsumoto et al. 2000; Harvey et al. 2000; Garzon et al. 2005; Youssuf et al. 2005 ; Vasserur et al. 2005; Al-Sadi 2007; Garzon et al. 2007; Al-Sadi et al. 2008; Lee and Moorman 2008). از سال ۱۹۹۴، نشانگر ISSR (Inter-simple sequence repeat amplification) در مطالعات ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت(Zietkiewicz et al. 1994). در این نشانگر، از آغازگرهای SSR تغییریافته با ردیف‌های غیرتکرار شونده به صورت قلاب شده در انتهای '۳ یا انتهای '۵ استفاده می‌کنند. ناحیه قلاب شده آغازگر، اجازه اتصال محکم‌تر آغازگر به جایگاه هدف را می‌دهد. استفاده از این نشانگر بسیار سریع و آسان است و به نظر می‌رسد که به دلیل طویل بودن آغازگرها، قابلیت تکثیر نشانگر SSR را نیز داشته باشد( Zietkiewicz et al. 1994; Tsmmura et al. 1996 ; Nagaoka and Ogihara 1997). این نشانگر به دلیل فراوانی مناطق تکرار شونده در ژنوم، چندشکلی بیشتری را نسبت به آغازگرهای RAPD نشان داده و باندهای حاصل اطلاعات بیشتری را از ژنوم می‌دهد (Esselman et al. 1999). بر اساس مطالعات روی گونه‌های گروه F پی‌تیوم با استفاده از این نشانگر مشخص شد که در ژنوم گونه‌های این گروه موتیف‌های تکراری وجود دارد و ثابت شده که نشانگر ISSR توانایی تمایز بالایی را در تجزیه‌های مربوط به مطالعه میکوریزها و پاتوژن‌ها دارد(Vasserur et al. 2005). پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه چغندرقند سال‌ها در استان‌های مختلف ایران دیده می‌شود و از آنجا که کشت چغندرقند در کشور حائز اهمیت می‌باشد، لذا داشتن اطلاع دقیق از نقش و اهمیت گونه‌های *Pythium* به عنوان عامل مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندرقند مهم می‌باشد. دو گونه *P. aphanidermatum* و *P deliense*. در استانهای خوزستان و خراسان به ترتیب گونه‌های بیماریزای غالب هستند (Afzali and Ershad 2006; Zamani Noor et al. 2004 ). در استان کرمانشاه نیز، در بین قارچ‌های بیماریزا در مزارع چغندرقند، *P. aphanidermatum* از بیشترین پراکندگی برخوردار است (Sheikholeslami et al. 2002). همچنین ثابت شده است که در مزارع چغندرقند شمال غرب ایران *P. aphanidermatum*, *P. ultimum* var. *ultimum* و *Pythium* group HS بیماریزای بسیار بالایی روی ریشه‌های چغندرقند دارند(Babai-Ahary et al. 2004).

## مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از مزارع مختلف چغندرقند استان‌های آذربایجان غربی، خراسان، فارس، تهران، کرمانشاه، لرستان، مرکزی و همدان در طول فصل زراعی و با بازرسی از مزارع انجام شد. نمونه‌برداری به تعداد ۱۰ تا ۲۰ نمونه از هر مزرعه بسته به وسعت آن انجام شد.

جداسازی

ریشه‌ها و گیاهچه‌های چغندرقند دارای علائم پوسیدگی به مدت ۲۰ دقیقه با آب شستشو داده شد. سپس به مدت ۲۰ ثانیه با الکل اتیلیک ۷۰ درصد ضدعفونی و پس از دو بار شستشو با آب مقطر استریل روی کاغذ صافی آبگیری شد. از نمونه‌های ضدعفونی شده قطعات نیم تا یک سانتمتری از فواصل بین بافت آلوده و سالم جدا شده و در محیط کشت CMA [عصاره‌ی ۶۰g دانه ذرت، ۲۰۰ mg کلرامفنیکل، ۱۶ g آگار و یک لیتر آب مقطر] کشت شدند. پرگنه‌های بدست آمده پس از تقریباً ۲۴ تا ۴۸ ساعت روی محیط کشت آب آگار دو درصد کشت و به روش نوک ریسه خالص شدند (Singelton et al. 1990). برای جداسازی *P. aphanidermatum* از خاک نیز از دو روش طعمه‌گذاری با بذر چغندرقند و دیگری کشت بذر چغندرقند در خاک آلوده و جداسازی قارچ از گیاهچه‌های آلوده به روش بالا انجام گرفت (Van der Plaats- Niterink Singelton et al. 1990 ;1982).

خالص‌سازی و شناسایی

برای تهیه قارچ خالص از جدایه‌ها از روش کشت نوک ریسه استفاده شد( Islam et al. 2004; Lamour and Hausbeck 2001; Lamour and Hausbeck 2000). شناسایی جدایه‌ها بر اساس



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.9.8 ]

کلیدها و ویژگی‌های مورفولوژیکی ( Van der Plaats- Niterink 1982) انجام شد (جدول ۱). برای تولید اندام‌های رویشی و زایشی سه قرص پنج میلی متری از هر جدایه در آب مقطر دو بار استریل شده‌ی حاوی بذور شاهدانه جوشانده شده قرار داده و در زیر نور فلورسانت نگهداری شدند. اسپورانژها به فاصله یک تا سه روز بعد تشکیل شده و مورد بررسی قرار گرفت.

جدول۱- مشخصات ۱۹ جدایه انتخاب شده بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی از گونه *P. aphanidermatum* و یک جدایه *P. deliense*

| نام جدایه | نام گونه | شکل پایه اووگونی | تاریخ جمع آوری(سال ۸۶) | منشا | محل جمع‌آوری | علائم بیماری |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 8D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | تیر | ریشه | آذربایجان غربی | پوسیدگی ریشه |
| 24D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | تیر | ریشه | آذربایجان غربی | پوسیدگی ریشه |
| 26A | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | اردیبهشت | خاک | فارس | مرگ گیاهچه |
| 17D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | آبان | ریشه | کرمانشاه | پوسیدگی ریشه |
| 10D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | تیر | ریشه | لرستان | پوسیدگی ریشه |
| 19A | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | اردیبهشت | خاک | فارس | مرگ گیاهچه |
| 16D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | تیر | ریشه | همدان | پوسیدگی ریشه |
| 19B | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | اردیبهشت | خاک | فارس | مرگ گیاهچه |
| 7D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | مهر | ریشه | تهران | پوسیدگی ریشه |
| 22D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | تیر | ریشه | کرمانشاه | پوسیدگی ریشه |
| 11D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | آبان | ریشه | لرستان | پوسیدگی ریشه |
| 15D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | مهر | ریشه | مرکزی | پوسیدگی ریشه |
| 23D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | آبان | ریشه | لرستان | پوسیدگی ریشه |
| 12D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | مرداد | ریشه | مرکزی | پوسیدگی ریشه |
| 21D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | تیر | ریشه | لرستان | پوسیدگی ریشه |
| 19D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | مهر | ریشه | آذربایجان غربی | پوسیدگی ریشه |
| 14D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | آبان | ریشه | لرستان | پوسیدگی ریشه |
| 18D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | مرداد | ریشه | خراسان | پوسیدگی ریشه |
| 5D | *P. deliense* | پایه اووگونی خمیده | مرداد | ریشه | خراسان | پوسیدگی ریشه |
| 13D | *P. aphanidermatum* | پایه اووگونی راست | آبان | ریشه | کرمانشاه | پوسیدگی ریشه |

اندازه‌گیری سرعت رشد

اندازه‌گیری سرعت رشد جدایه‌ها در دو دمای ۲±۲۶ و ۲±۲۹ °C ، با چهار تکرار ، انجام شد. قطر کلنی‌های تشکیل شده بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت از کشت اندازه‌گیری و ثبت شد.

مطالعات مولکولی

تهیه توده میسلیوم

جهت تهیه توده میسلیوم، حدود سه قرص از حاشیه فعال کشت دو روزه جدایه‌ها به فلاسک‌های حاوی ۵۰ ml از محیط کشت مایع (عصاره‌ی ۲۰۰ g سیب زمینی و ۱۵ mg دکستروز) منتقل و در دمای ۲۵ °C به مدت چهار تا هفت روز روی شیکر در ۱۱۰rpm نگهداری شدند. بعد از تشکیل توده های میسلیومی به قطر دو سانتی‌متر، توده میسلیوم‌ها با آب مقطر سترون شستشو و آبگیری شده و بلافاصله در دمای ۷۰- °C نگهداری شدند (Matsumoto et al. 2000).

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از روش صفایی و همکاران (روش کاربرد محلول نمکی DNA) استفاده شد(Safaie et al. 2005). اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه بیوفتومتر و الکتروفورز نمونه‌های استخراج شده در ژل آگاروز ۰/۸ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.9.8 ]

شناسایی *P. aphanidermatum* با استفاده از آغازگر نیمه اختصاصی

به منظور شناسایی مستقیم جدایه‌ها، از یک جفت آغازگر نیمه اختصاصی (Pa1:5'-CCACGTGAACCGTTGAAATC-3', ITS2: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') استفاده شد(Wang et al. 2003). واکنش PCR در مخلوط واکنش ۲۰ میکرولیتری حاوی ۲ µl از PCR Buffer (50 mM KCL, 10 mM Tris-HCL, pH 9.0)، ۲ mM $MgCL_2$، ۱۰۰ µM از هر یک از dNTPها، ۰/۴ µM از هر یک از آغازگرهای Pa1 و ITS2، ng ۲۰ از DNA نمونه و ۲ واحد آنزیم *Taq* polymerase در ترموسایکلر اپندروف گرادیانت انجام شد. تکثیر قطعات DNA، با واسرشته‌سازی اولیه DNA ژنومی در دمای ۹۴ °C به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه شامل ۹۴ °C به مدت یک دقیقه، ۶۷ °C به مدت دو دقیقه، ۷۲ °C به مدت دو دقیقه و ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصولات PCR به همراه نشانگر نردبان ژنومی bp ۱۰۰ روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد به مدت یک ساعت الکتروفورز شد.

نشانگر ISSR

جهت بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها، ۱۸ آغازگر ISSR مورد مطالعه قرار گرفتند که از میان آنها تعداد هشت آغازگر تکرارپذیری و چند شکلی بیشتری را نشان دادند لذا برای کلیه جدایه‌ها استفاده شدند (جدول ۲). واکنش PCR با استفاده از این آغازگرها در مخلوط واکنشی ۲۵میکرولیتری حاوی ۲/۵ µL از PCR Buffer، ۱/۵ mM MgCl2، ۲۰۰ µM از هر یک از dNTPها، ۰/۴ µM از هر یک از آغازگرهای ISSR، ng ۱۵ از DNA نمونه و ۲/۵ واحد آنزیم *Taq* polymerase در ترموسایکلر اپندروف گرادیانت و طبق برنامه‌های تکثیر ذکر شده در جدول ۳ انجام گرفت

ارزیابی محصولات PCR با الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد در بافر 1X TBA (تریس بازی g/lit ۱۰/۸، اسیدبوریک g/lit 5.5، EDTA نیم مولار ml/lit ۴) و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. برای تخمین اندازه قطعات تکثیر شده طی واکنش PCR، از نشانگریک kb استفاده شد (شکل ۳).

جدول ۲- توالی آغازگرهای ISSR استفاده شده در این مطالعه

| آغازگر | توالی | منبع | دمای اتصال(°C) |
|---|---|---|---|
| $(TGTC)_5$ | 5'-TGTCTGTCTGTCTGTCTGTC-3' | (Xue et al. 2006) | ۵۸ |
| P1 | 5'-TCTCTCTCTCTCTCTCC-3' | (Stepansky et al. 1999) | ۵۲ |
| P4 | 5'-CTGGTGTGTGTGTGTGTGT-3' | (Bornet and Branchard, 2004) | ۵۴ |
| ISSR02 | 5'-ACTGACTGACTGACG-3' | (Sharma et al. 2005) | ۵۳ |
| LB-A | 5'-$(GACA)_4$ TA-3' | (Arbaoui et al. 2008) | ۵۲ |
| LB-B | 5'-$(GACA)_4$TT-3' | (Arbaoui et al. 2008) | ۴۸ |
| LB-C | 5'-$(GACA)_4$GT-3' | (Arbaoui et al. 2008) | ۴۸ |
| PcMs | 5'-$(GTC)_7$-3' | (Arbaoui et al. 2008) | ۶۷ |

برای بدست آوردن ماتریس شباهت بین جدایه‌ها، وجود و عدم وجود هر یک از باندها به صورت اعداد صفر و یک تعیین شد. بر اساس نتیجه ماتریس شباهت که با استفاده از ضریب تشابه جاکارد بدست آمده بود و تجزیه و تحلیل خوشه‌ای به کمک روش UPGMA در نرم افزار MVSP، دندروگرام مربوط به مجموع آغازگرها رسم شد.

## نتایج و بحث

شناسایی گونه *P. aphanidermatum*

در شناسایی مورفولوژیکی گونه براساس شکل پرگنه و تولید ریسه‌های هوایی در محیط کشت CMA و شکل اسپورانژها، ۲۰ جدایه شناسایی شد که در شناسایی مولکولی توسط جفت آغازگر نیمه اختصاصی Pa1/ITS2 نیز در این ۲۰ جدایه یک قطعه ۲۱۰ جفت بازی تکثیر شد (شکل۱ و ۲). جدایه‌های گونه *P. aphanidermatum* از لحاظ ویژگی‌های مورفولوژیکی به قدری با هم مشابهت دارند که تمایز و بررسی آنها از روی صفات مورفولوژیکی بسیار مشکل می‌باشد. نه تنها جدایه‌های گونه *P. aphanidermatum*، بلکه حتی دو گونه *P. aphanidermatum* و *P. deliense* نیز از لحاظ بسیاری از صفات مورفولوژیکی مشابه هم می‌باشند طوری که بعضی از محققین این دو گونه را یکی تلقی می‌کنند. از آنجا که این آغازگر نیمه اختصاصی، قادر به تفکیک این دو گونه نبود لذا جهت تفکیک جدایه‌ها از این لحاظ،



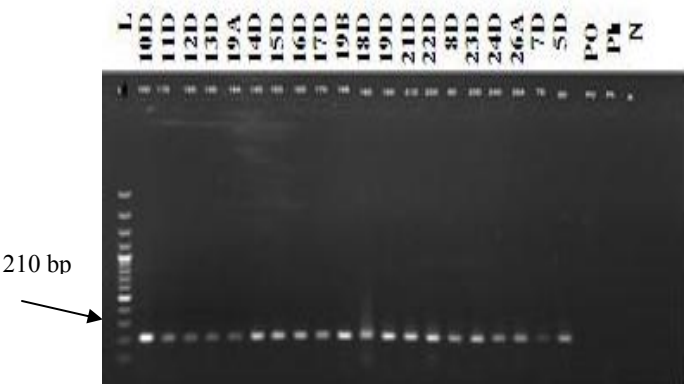
[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.9.8 ]

جدول ۳- چرخه‌های دمایی واکنش PCR،آغازگرهای مربوط به نشانگر ISSR

| آغازگرهای LB-B ، LB-A و LB-C | | | آغازگر $(TGTC)_5$ | | |
|---|---|---|---|---|---|
| مراحل | درجه حرارت | مدت زمان | مراحل | درجه حرارت | مدت زمان |
| واسرشت اولیه | ۹۴°C | ۲ دقیقه | واسرشت اولیه | ۹۵°C | ۵ دقیقه |
| واسرشت سازی | ۹۴°C | ۱ دقیقه | واسرشت سازی | ۹۴°C | ۲۰ ثانیه |
| اتصال | ۵۳°C | ۱ دقیقه | اتصال | ۵۸°C | ۱ دقیقه |
| گسترش اولیه | ۷۲°C | ۵ دقیقه | گسترش اولیه | ۷۲°C | ۲۰ ثانیه |
| گسترش نهایی | ۷۲°C | ۱۰ دقیقه | گسترش نهایی | ۷۲°C | ۶ دقیقه |
| | ۳۵ چرخه | | ۴۰ چرخه | | |
| آغازگرهای P1 ، P4 و ISSR02 | | | آغازگر PcMs | | |
| مراحل | درجه حرارت | مدت زمان | مراحل | درجه حرارت | مدت زمان |
| واسرشت اولیه | ۹۵°C | ۵ دقیقه | واسرشت اولیه | ۹۴°C | ۵ دقیقه |
| اتصال اولیه | ۴۵°C | ۴۵ ثانیه | اتصال اولیه | ۶۸°C | ۲ دقیقه |
| گسترش اولیه | ۷۲°C | ۱ دقیقه | گسترش اولیه | ۷۰°C | ۲ دقیقه |
| واسرشت سازی | ۹۵°C | ۱ دقیقه | واسرشت سازی | ۹۴°C | ۱ دقیقه |
| اتصال | ۴۵°C | ۴۵ ثانیه | اتصال | ۶۸°C | ۱ دقیقه |
| گسترش | ۷۲°C | ۱ دقیقه | گسترش | ۷۰°C | ۲ دقیقه |
| گسترش نهایی | ۷۰°C | ۱۰ دقیقه | گسترش نهایی | ۷۰°C | ۱۰ دقیقه |
| | ۳۸ چرخه | | ۴۴ چرخه | | |

از ویژگی‌های مورفولوژیکی استفاده شد و براساس خمیده یاراست بودن پایه اووگونی همه جدایه‌ها به جز یک جدایه، *P. aphanidermatum* تشخیص داده شد (شکل ۲) و یک جدایه هم به عنوان *P. deliense* شناسایی شد که مربوط به استان خراسان بود و قبلاً نیز این گونه از چغندرقند از استان خراسان جدا و معرفی شده بود (Afzali and Ershad 2006). گونه *P. aphanidermatum* دارای پایه اووگونی راست و گونه *P. deliense* دارای پایه اووگونی خمیده می‌باشد. با توجه به این نتایج مشخص شد که در این مطالعه، روش مولکولی خود به تنهایی قادر به تفکیک دو گونه‌ی بسیار نزدیک به هم نیست در حالیکه با استفاده از روش مورفولوژیکی می‌توان این دو گونه را از هم تفکیک کرد. از طرفی هم استفاده از روش‌های مورفولوژیکی در شناسایی گونه‌ها و جدایه‌ها، به دلیل تغییرپذیری ساختارهای مورفولوژیکی این جنس، بسیار مشکل و زمان‌بر می‌باشد و نباید صرفاً به مطالعات مورفولوژیکی بسنده کرد. لذا استفاده از روش مولکولی جهت شناسایی جدایه ها، زمانی راحت‌تر و سریع‌تر خواهد بود که یک آغازگر کاملاً اختصاصی برای شناسایی گونه‌ی مورد نظر وجود داشته باشد.

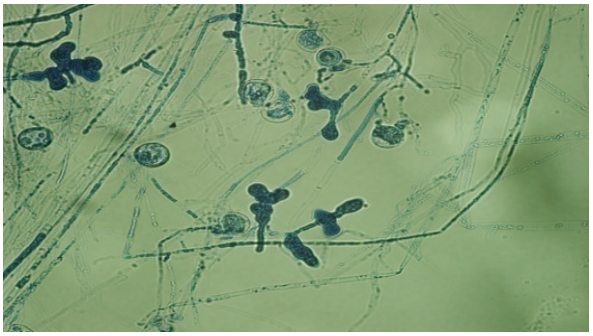
تجزیه و تحلیل داده‌ها در دو دما، با نرم‌افزار MSTATC و MVSP، جدایه‌ها را در فاصله اقلیدوسی ۲/۴ به دو گروه مجزای کند رشد I (۴۲ درصد جدایه‌ها) و تند رشد II (۵۸ درصد جدایه‌ها) تقسیم بندی کرد (شکل۳). سرعت رشد جدایه های کند




شکل ۱- الگوی باندی بدست آمده از جدایه‌های *P. aphanidermatum* با استفاده از جفت آغازگر Pa1/ITS2 ; L: نشانگرنردبان ژنومی ۱۰۰ bp، چاهکهای 10D تا 7D مربوط به جدایه های *P. aphanidermatum* می باشند که مشخصات آنها به طور کامل در جدول ۱ آورده شده است، 5D: گونه *P. deliense* ، PO: *P. oliganderum* ،Ph: *Phytophthora* ،N: کنترل منفی



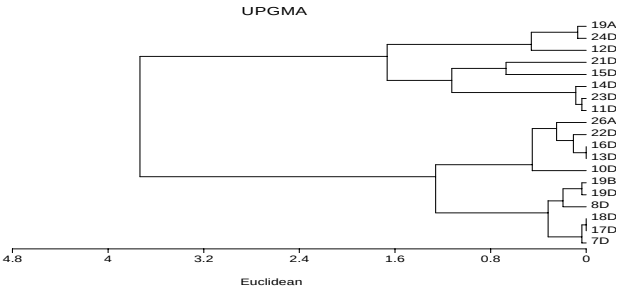
[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.9.8 ]



شکل۲- مورفولوژی اسپورانژیوم و اووگونی قارچ *P. aphanidermatum*

سرعت رشد جدایه‌ها

رشد به طور متوسط ۲/۳۱ و ۱/۸ سانتیمتر در روز و سرعت رشد جدایه‌های تند رشد نیز ۴/۹۳ و ۵ سانتیمتر در روز به ترتیب در دمای $^{o}C$ ۲±۲۶ و $^{o}C$ ۲±۲۹ بود. در این مطالعه ارتباطی بین سرعت رشد جدایه‌ها و پراکنش جغرافیایی آنها مشاهده نشد.

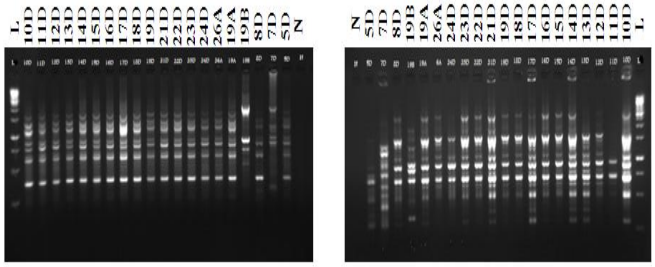



شکل۳- گروه‌بندی ۱۹ جدایه *P. aphanidermatum* بر اساس سرعت رشد در دو دمای $^{o}C$ ۲±۲۶ و $^{o}C$ ۲±۲۹

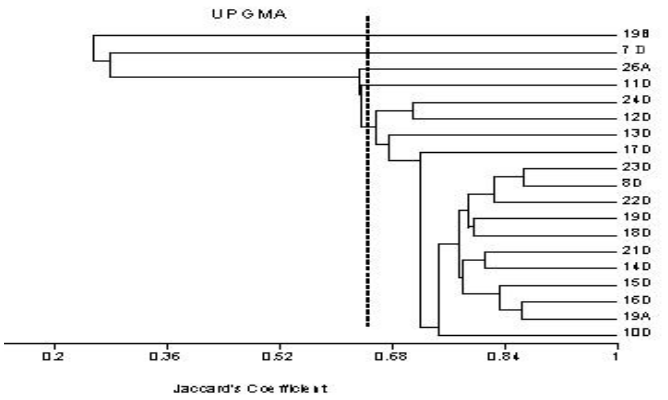
تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. aphanidermatum* بر اساس نشانگر ISSR

نتایج حاصل از تلفیق هشت آغازگر و تجزیه خوشه‌ای آنها بر اساس ضریب تشابه جاکارد نشان داد که در سطح تشابه ۶۴ درصد جدایه‌ها به پنج گروه تقسیم شدند(شکل۴ و ۵). گروه اول شامل یک جدایه از فارس، گروه دوم شامل یک جدایه از تهران، گروه سوم شامل یک جدایه از فارس، گروه چهارم شامل یک جدایه از استان لرستان و گروه پنجم با درصد فراوانی ۷۸/۹۴ درصد شامل جدایه‌هایی از آذربایجان غربی، خراسان، فارس، کرمانشاه، لرستان، مرکزی و همدان بود. در این مطالعه با اینکه جدایه‌ها از لحاظ سرعت رشد در دو گروه کاملاً مجزا قرار گرفتند ولی دارای شباهت‌های مولکولی بسیار نزدیکی بودند طوری که بررسی مولکولی با این نشانگر، هیچگونه تمایزی را بین جدایه‌های تند رشد و کند رشد آشکار نکرد. لذا هیچ ارتباطی بین پراکنش جغرافیایی و نیز میزان سرعت رشد جدایه‌ها بر اساس مطالعات مولکولی یافت نشد.

در سال‌های اخیر با پیشرفت تکنولوژی مولکولی و امکان مطالعه دقیق تنوع ژنومی در میکروارگانیسم‌ها، ابزار لازم برای شناسایی تنوع ژنتیکی درون افراد یک گونه به خوبی فراهم شده‌است. قارچ *P. aphanidermatum* عامل بیماری پوسیدگی پی‌تیومی به علت اهمیتی که دارد در اکثر نقاط دنیا موضوع تحقیقات مختلف بر اساس نشانگرهای مولکولی بوده‌است. بررسی نواحی ISSR روشی است که به سرعت تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های یک گونه را نشان می‌دهد. از این نشانگر در مطالعه تنوع ژنتیکی پاتوژن‌های




شکل۴- الگوی باندی DNA تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای به ترتیب از چپ به راست ISSR02 و LB-A با نشانگر مولکولی ISSR، در ۱۹ جدایه *P. aphanidermatum*: چاهکهای 10D تا 7D مربوط به جدایه های *P. aphanidermatum* می باشند که مشخصات آنها به طور کامل در جدول ۱ آورده شده است، 5D: گونه *P. deliense* ، L: نشانگر نردبان ژنومی 1Kb N: کنترل منفی




شکل۵-گروهبندی حاصل از تنوع ژنتیکی ۱۹ جدایه *P. aphanidermatum* با استفاده هشت آغازگر ISSR



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.9.8 ]

زیادی از جمله فوزاریوم(Ratnaparkhe et al. 1998) و غیره استفاده شده‌است. در این مطالعه بر اساس تجزیه و تحلیل باندهای حاصل از هشت آغازگر ISSR، چهار جدایه هر کدام در گروه‌های مجزا و ۱۵ جدایه نیز در یک گروه قرار گرفتند که شامل هر دو جدایه‌های تند رشد و کند رشد بود. این نتایج نشان دهنده شباهت ژنتیکی بسیار زیاد بین این جدایه‌ها می‌باشد و در واقع نشان می‌دهد که گونه *P. aphanidermatum* از کمترین تنوع درون گونه‌ای برخوردار است. همچنین نمی‌توان بر اساس این نشانگر مولکولی جدایه‌های تند رشد را از جدایه‌های کند رشد متمایز کرد. در این مطالعه نه تنها جدایه‌ها مشابه هم بودند بلکه قرابت بسیار نزدیکی با گونه *P. deliense* داشتند به طوری که نشانگر ISSR قادر به تفکیک این دو گونه از یکدیگر نشد. چنین نتیجه‌ای ، در مطالعه دیگری نیز بدست آمد( Youssuf et al. 2005). همچنین بر اساس این مطالعه مشخص شد که دو گونه *P. aphanidermatum* و *P. deliense* از نظر دمای رشد مشابه می‌باشند. نتایج حاصل از گروه‌بندی مولکولی، ارتباطی بین جدایه‌ها و نواحی جغرافیایی و همچنین سرعت رشد آنها نشان نداد. نکته قابل توجه در این تجزیه و تحلیل‌های مولکولی این بود که همه آغازگرهای ISSR استفاده شده در این تحقیق به استثنا آغازگر LB-B، دو جدایه 7D و 19B به ترتیب مربوط به استان تهران و فارس را از دیگر جدایه‌ها مجزا کرده و در گروه‌های جداگانه‌ای قرار دادند. طی یک تحقیقی روی *P. aphanidermatum* در عمان، با استفاده از نشانگر AFLP مشخص شد که جدایه‌های *P. aphanidermatum* مربوط به عمان و دیگر مناطق شباهت ژنتیکی بسیار بالایی(۹۴ درصد) دارند(Al-Sadi et al. 2008). همچنین بر اساس مطالعه روی نواحی ITS نیز مشاهده شد که گونه *P. aphanidermatum* کمترین تنوع درون گونه‌ای را در توالی‌های ITS دارا می‌باشد(Al-Sadi 2007). همچنین با مطالعه‌ای که روی سه گونه *P. aphanidermatum*, *P. ultimum* و *P. irregulare* با استفاده از انگشت نگار AFLP انجام شد، مشخص شد که در *P. aphanidermatum* بین جدایه‌ها کمترین فاصله ژنتیکی(۱۵ درصد) وجود دارد و بعد از آن هم جدایه‌های *P. ultimum* با فاصله ژنتیکی ۳۷ درصد بودند. جدایه‌های *P. irregulare* بیشترین فاصله ژنتیکی(۶۴ درصد) را نشان دادند(Garzon et al. 2005). در کل می‌توان نتیجه گرفت که گونه *P. aphanidermatum* از کمترین تنوع درون گونه‌ای برخوردار است.

## منابع

Afzali H, Ershad D (2006) The causal agents of root rot and damping-off sugar beet in Khorasan province and relation of plant age and *Pythium* spp. 17th Iranian Plant Protection Congress, 2-5 Sept.

Al-Sadi AM, Drenth A, Deadman M L, Aitken AB (2008) Genetic diversity, aggressiveness and metalaxyl sensitivity of *Pythium aphanidermatum* populations infecting cucumber in oman. Plant pathology, 56: 140-149.

Al-Sadi AM (2007) Population diversity, sources and evaluation of metalaxyl-based management of *Pythium* damping-off of cucumber in oman. Plant pathology 57: 45-56.

Arbaoui A, Kraic J, Huszar J (2008) Genetic variation of *Sclerotinia Scleritiorum* isolates form different conditions. Agriculture 54(1): 36-39.

Babai-Ahary A, Abrinnia M, Majidi Heravan I (2004) Identification and pathogenicity of *Pythium* species causing damping-off in sugarbeet in northwest Iran. Australasian Plant Pathology, 33: 343-347.

Bornet B, Branchard M (2004) Using of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity in several related *Brassica* taxa and *Arabidopsis thaliana*. Hereditas 140: 245-248.

Chen W (1992) Restriction fragment length polymorphisms in enzymically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Pythium* species. Phytopathology 82(12): 1467-1472.

Esselman EJ, Jianqiang L, Crawford D J, Winduss JL, Wolfe AD (1999) Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. Molecular Ecology 8:443-451.

Francis DM, Gehlen MF, Clair DA (1994) Genetic variation in homothallic and hyphal swelling isolates of *Pythium ultimum* var. *ultimum* and *P. ultimum* var. *sporangiferum*. Molecular Plant Microbe Interact, 7(6): 766-775.

Garzon CD, Yanez JM, Moorman GW (2007) *Pythium cryptoirregular*, a new species within the *P. irregulare* complex. Mycologia 99(2): 291-301.

Garzon CD, Geiser DM, Moormam GW (2005) Diagnosis and population analysis of *Pythium* species using AFLP fingerprinting. Pennsylvania State University, University Park 16802, USA.

Harvey PR, Butterworth PJ, Hawke BG, Pankhurst CE (2000) Genetic variation among populations of *Pythium irregular* in southern Australia. Plant Pathology 49: 619-627.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.9.8 ]

Herrero ML, Klemsdal SS (1998) Identification of *Pythium aphanidermatum* using the RAPD technique. Mycology Research 102:136-140.
Islam SZ, Babadoost M, Lambert KN, Ndeme A, Fouly, HM (2004) Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from processing pumpkin in Illinois. Plant disease 89: 191-197.
Kageyama K, Uchino H, Hyakumachi M (1998) Characterization of the hyphal swelling group of *Pythium*: DNA polymorphisms and cultural and morohological characteristics. Plant Disease 82: 218-222.
Lamour KH, Hausbeck MK (2001) Investigating the spatiotemporal genetic structure of *Phytophthora capsici* in Michigan. Phytopathology, 91: 973-980.
Lamour KH, Hausbeck MK (2000) Mefenoxam insensitivity and sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. Phytopathology 90: 396-400.
Lee S, Moorman GW (2008) Identification and characterization of simple sequence repeat markers for *Pythium aphanidermatum*, *P. cryptoirregulare* and *P. irregulare* and the potential use in *Pythium* population genetics. Current Genetics, 53(2): 81-93.
Levesque CA, de Cock Awam (2004) Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. Mycology Research, 108: 1363-1383.
Martin FN (2000) phylogenetic relationships among some *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially encoded cytochrome oxidase II gene. Mycologia, 92: 711-727.
Matsumoto C, Kageyama K, Suga H, Hyakumachi M (2000) Intraspecific DNA polymorphisms of *P. irregular*. Mycology research 104(11): 1333-1341.
Nagaoka T, Ogihara Y (1997) Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RAPD and RFLP markers. Theor Appl Genet Journal 94: 597-602.
Ratnaparkhe MB, Santra DK, Tullu A, Muehlbauer F J (1998) Inheritance of inter-simple- sequence- repeat polymorphisms and linkage with a *fusarium* wilt resistance gene in chickpea. Theor Appl Genet 96: 348-353.
Rush CM (1987) Root rot of sugar beet caused by *Pythium deliense* in the Texas Panhandle. Plant Disease 71:469.
Safaie N, Alizadeh A, Saidi A, Rahimian H, Adam G (2005) Molecular characterization and genetic diversity among Iranian populations of *Fusarium graminearum*, the causal agent of wheat headblight. Iran. J. of Plant Pathology, 41: 171-189.
Singelton LL, Mirial JD, Rush CM (1990) Methods for Reaserch on Soilborn Phytopathogenic Fungi. APS Press.
Sharma M, Gupta SK, Sharma TR (2005) Characterization of variability in *Rhizoctonia solani* by using morphological and molecular markers. Phytopathology 153: 449-456.
Sheikholeslami M, Younesi H, Ershad J (2002) Identification of fungi involving sugar beet rot and their distribution in Kermanshah Provinc.15th Iranian Plant Protection Congress, 133p.
Stepansky A, Kovalski I, Perl-Treves R (1999) Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. Plant. Syst. Evol. 217: 313–332.
Tsmmura Y, Ohba K, Strauss SH (1996) Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (Pseudotsuga menziesii) and sugi (Cryptomeria japonica). Theor. Appl. Genet journal 92: 40-45.
Van der Plaats- Niterink AJ (1982) Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology. Studies in Mycology 21: 1-242.
Vasserur V, Rey P, Bellanger E, Brygoo Y, Tirilly Y (2005) Molecular characterization of *Pythium* group F isolates by ribosomal- and intermicrosatellite-DNA regions analysis. European Journal of Plant Pathology 112: 301-310.
Wang PH, Wang YT, White JG (2003) Species-specific PCR primers for *Pythium* developed from ribosomal ITS1 region. Letters in Applied Microbiology 37:127-132.
Xue S, Xuecheng Z, Yunxiang M, Zhenghong S, Song Q (2006) Identificetion of phase and sex-related ISSR markers of red alga *Gracilaria lemaneiformis*. Journal of Ocean Univrsity of China 5(1): 82-84.
Youssuf AMH, Hani MAA, Jochen M, El-Hariry H (2005) Morphological and molecular identification of some closely related *Pythium* species in Egypt. Phytopathology and Plant Protection 38 (3): 193-208.
Zamani Noor N, Minassian V, Banihashemi Z, Mostowfizadeh R (2004) Identification and pathogencity of *Pythium* species on sugar beet in Khuzestan province. General Plant Pathology 40:179-200.
Zietkiewicz E, Fafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.9.8 ]