شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Botrytis cinerea* عامل کپک خاکستری توت‌فرنگی در استان کردستان

Identification and Study of Genetic Diversity of *Botrytis cinerea* Isolates Caused Strawberry Grey Mold in Kurdistan Province

ساقی یونسی بانه[۱]، محمدجواد سلیمانی[۲*]، دوستمراد ظفری[۳] و بهمن بهرام نژاد[۴]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۶/۲۴

چکیده

تعداد ۱۹ جدایه بوتریتیس از توت‌فرنگی‌های دارای علائم بیماری کپک خاکستری از مزارع و گلخانه کشت هیدروپونیک توت‌فرنگی از استان کردستان جمع‌آوری شدند. جدایه‌ها براساس خصوصیات مورفولوژیکی به‌عنوان گونه *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., تشخیص داده شدند. به‌منظور تأیید و شناسایی بیشتر گونه موردنظر به روش مولکولی از آغازگرهای اختصاصی C729 استفاده شد. جدایه‌های مورد بررسی با انجام PCR با آغازگر اختصاصی و تکرار آزمایش باند ۷۰۰ جفت‌بازی مختص گونه را تکثیر کردند. تنوع ژنتیکی جدایه‌های موجود با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده از مطالعه تنوع ژنتیکی، جدایه‌ها در چهار گروه اصلی قرار گرفتند. با توجه به نحوه‌ی گروه‌بندی جدایه‌ها، در نگاه اول مشاهده شد که گروه جدایه‌های گلخانه از گروه جدایه‌های مزارع مختلف تفکیک شدند اما برخی جدایه‌ها از این الگو پیروی نکرده و متفاوت بودند. همچنین در بررسی جدایه‌های مزارع حومه استان و ارتباط آنها با یکدیگر، ارتباط مشخصی بین نزدیکی جدایه‌ها از لحاظ جغرافیایی و خصوصیات ژنتیکی و الگوی RAPD آنها با هم وجود نداشت بلکه بعضاً مشاهده شد که برخی جدایه‌های دور از هم از لحاظ جغرافیایی شباهت بیشتری به همدیگر، نسبت به جدایه‌های جمع‌آوری شده از مزارع نزدیک به هم داشتند.

واژه‌های کلیدی: *Botrytis cinerea*، مورفولوژی، آغازگر اختصاصی، PCR، تنوع ژنتیکی، RAPD

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان
۲. دانشیار، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان
۳. دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان
۴. دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج
*: نویسنده مسوول Email: j_soleimaniuk@yahoo.co.uk

مقدمه

گونه‌های *Botrytis* در ارتباط با میزبان‌های گیاهی خود در سال‌های ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۰ گزارش شده اند اما تحقیقات کاملی روی گونه‌های این جنس در سال‌های ۱۹۷۱-۱۹۸۰ انجام شده است. این قارچ توسط کنیدیوفورهای مستقیم و بندبند، هیف ضخیم و پرگنه خاکستری، کنیدی‌های بیضوی-تخم‌مرغی و تک‌سلولی و اسکلروت‌های سیاه مشخص می‌شوند. اسکلروت‌ها در بقایای گیاهی زمستان‌گذرانی می‌کنند. دمای ایده‌آل برای رشد این قارچ ۲۵ تا ۳۰ درجه و ماکزیمم ۴۰-۳۷ و مینیمم ۱- درجه سانتی‌گراد است. گونه‌های *Botrytis* به‌دلیل داشتن کنیدیوم‌های چندهسته‌ای و سازگاری رویشی دارای تغییرات ثابتی در طول دوره‌ی تولیدمثل در شرایط آزمایشگاه و محیط‌های زراعی هستند. تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی در گونه *B. cinerea* معمول است. *B. cinerea* یکی از پاتوژن‌های قارچی نکروتروف است که به‌طور جامع مطالعه شده است. این قارچ روی دامنه وسیعی از گیاهان میزبان به‌صورت یک ساپروفیت یا پارازیت رشد می‌کند و گاهی حالت بیماری شدید روی گیاهان زینتی، سبزیجات یا حتی نهال‌های درختان ایجاد می‌کند. این بیمارگر خصوصاً در هوای مرطوب توسعه می‌یابد. گونه *B. cinerea* یک بیمارگر مهم میوه‌های انباری میوه‌های در حال حمل‌ونقل و سبزیجات و محصولات زینتی و نهال‌ها است *جرویس* (Jarvis, 1997). *B. cinerea* در توت‌فرنگی از بدو تشکیل غنچه‌های گل می‌تواند وارد اندام‌های اولیه تشکیل میوه شود و تا زمان رسیدگی میوه آنجا بماند و یا در زمان نرم شدن یا صدمه خوردن میوه وارد شده، در داخل یا روی میوه فعالیت تخریبی خود را آغاز کند. این کپک‌ها در هنگام بارندگی و هوای مرطوب صدمات بیشتری می‌زنند. عامل بیماری در هوای گرم فعالیت بهتری دارد و در دمای نزدیک به صفر هم، با شدت کمتری به توسعه خود ادامه می‌دهد. میوه برداشت شده از حساسیت بیشتری نسبت به این بیماری برخوردار است. این قارچ یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای گل‌های رز است و بیماری کپک خاکستری را در این گیاه ایجاد کرده که یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این محصول در دنیا می‌باشد. در ایران *B. cinerea* بر روی گلایول، مرکبات، کاملیا، پامچال، ختمی و پیاز نیز گزارش شده است. این قارچ برای رشد مطلوب خود نیاز به آب‌وهوای خنک (۲۳-۱۸ درجه سانتی‌گراد) و مرطوب دارد. بیمارگر در دمای پایین فعال است و خسارات قابل‌توجهی روی محصولات با دوره انبارداری طولانی ایجاد می‌کند حتی اگر دما حدود ۱۰-۰ درجه سانتی‌گراد باشد *زاده‌دباغ* و همکاران (Zadehdabagh *et al.*, 1998).

پیشرفت‌هایی اخیرا در ژنتیک مولکولی و تکنولوژی زیستی صورت گرفته است و ابزارهای قدرتمند و جدیدی را برای اصلاح ژنتیکی فراهم کرده است. یکی از مفیدترین این ابزارها نشانگرهای مبتنی بر DNA می‌باشند که تکرارپذیر بوده و نشان‌دهنده تفاوت‌های اطلاعات ژنتیکی (ردیف‌های بازی DNA) موجود بین افراد در داخل و بین جمعیت‌ها می‌باشند. تا چندی پیش در اکثر آزمایشات بیوتکنولوژیکی از نشانگر مولکولی RFLP (Fragment Length Restriction Polymorphism) استفاده می‌شد. آشکارسازی باندهای حاصل از این روش نیازمند هیبریداسیون با نشانگرهای رادیواکتیو است که علاوه‌بر خطرناک‌بودن بسیار پر زحمت و از نظر فنی مشکل است و زمان و هزینه زیادی را می‌طلبد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) از زمان شروع در بسیاری از روش‌های استاندارد زیست‌شناسی مولکولی تحول بزرگی ایجاد کرد. برحسب نیاز و با تغییراتی که در روش اصلی اعمال گردید گروه دیگری از نشانگرهای مولکولی مانند RAPD و AFLP معرفی گردیدند. RAPD اولین بار توسط ویلیامز و همکاران معرفی شد و بر پایه تکثیر تصادفی DNA بوده و پلی‌مورفیسم مشاهده شده در بین ژنوتیپ‌های مختلف به‌دلیل تفاوت توالی در یک یا هر دو جایگاه اتصال پرایمر است که به‌صورت حضور یا فقدان یک باند به‌خصوص متجلی می‌شود. پرایمرهای RAPD مختص به ژنوتیپ، گونه یا جنس خاصی نیست و قابل استفاده در همه موجودات می‌باشد. همچنین هیچ نیازی به داده‌های اولیه در مورد توالی DNA جهت طراحی پرایمر نیست و بررسی همزمان بیش از یک مکان ژنی در این تکنیک وجود دارد. به‌طورکلی این روش قابل اجرا با حداقل امکانات مورد نیاز در آزمایشات بیوتکنولوژیکی است و عمده هزینه آن مربوط به آنزیم DNA پلیمراز می‌باشد. روش استفاده از مارکرهای مولکولی RAPD در ساختار ژنتیکی جمعیت *B. cinerea* در بررسی وجود ارتباط بین الگوی RAPD با منشاء جدایه‌ها و قدرت بیماریزایی و حساسیت به قارچ‌کش‌ها نیز کاربرد وسیعی داشته است *مویانو* و همکاران (Moyano *et al.*, 2003).

نشانگر RAPD اولین بارتوسط *واندر برگمن* و همکاران در سال 1993 جهت بررسی تنوع در جدایه‌های قارچ *B. cinerea* استفاده شد. آنها با استفاده از ۵۰ آغازگر هشت جدایه مزرعه‌ای از هلند را مورد مطالعه قرار داده و دریافتند که همه آنها دارای تمایز و تفاوت هستند. در تحقیقی که توسط *کرسیس و باسکر-ون زیسن* (Kerssies and Bosker-van Zessen, 1997) بر روی جدایه‌های جمع‌آوری شده *B. cinerea* صورت گرفت درصد بیماری‌زایی در بین جدایه‌های جمع‌آوری شده در یک روز به

همان اندازه متفاوت بود که بین جدایه‌های جمع‌آوری شده در ماه‌های متفاوت به‌دست آمد. آزمون RAPD در بین ۳۰ جدایه منتخب *B. cinerea* با بیماری‌زایی نسبتاً متفاوت صورت گرفت و آنالیز خوشه‌ای در نتایج آزمایش وجود چهار گروه را نشان داد. اکثراً همه جدایه‌ها از لحاظ ژنتیکی متفاوت بودند و هیچ ارتباطی میان بیماری‌زایی، زمان نمونه‌برداری و مکان آنها و الگوی RAPD دیده نشد. طبق مطالعات این دو محقق، منابع و کانون‌های متفاوت اسپورزایی جدایه‌ها، احتمالاً مسئول ایجاد این تفاوت‌ها هستند. در تحقیقی که توسط *تامسون و لاتور* (Thompson and Latorere, 1999) انجام شد جدایه‌های ناشی از میزبان‌های مختلف از شیلی شناسایی شدند و مورد مطالعه قرار گرفتند. در نتیجه این آزمایش، تنوع ژنتیکی که توسط آنالیز RAPD بین جدایه‌های *B. cinerea* دیده شد وجود یک ارتباط احتمالی میزبان- پاتوژن را نشان داد. در تحقیقی که توسط *آلفونسو* و همکاران (Alfonso *et al.*, 2000) بر روی جمعیت‌های *B. cinerea* روی محصولات گلخانه‌ای در جنوب‌شرقی اسپانیا انجام دادند که نتایج نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی زیاد و گوناگونی‌های مورفولوژیکی زیادی در ساختار جمعیت‌های *B. cinerea* بود. *مویانو* و همکاران (2003) ۴۴ جدایه از اسپانیا از ۶ گلخانه را به کمک آزمون RAPD مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند فقط دو گروه متفاوت وجود دارند که شامل بیش از یک عضو هستند، یکی از گروه‌ها از ۳ جدایه و دیگری از دو جدایه تشکیل شده است که شامل جدایه‌های مقاوم به قارچ‌کش پروسیمیدون و حساس به بنزیمیدازول بودند که در یک دسته قرار گرفتند.

در ایران برای اولین بار قارچ *B. cinerea* از مزارع انگور جداسازی شده و به‌منظور شناسایی گونه موردنظر از ویژگی‌های مورفولوژیکی استفاده شد و همچنین به‌منظور قطعیت بیشتر در شناسایی گونه در جدایه‌ها بررسی مولکولی با استفاده از توالی‌یابی نواحی ITS1 و ITS2 و توالی ۵/۸S DNA ریبوزومی انجام شد. اما با توجه به تفاوت زیادی که در شکل و اندازه اسکلروت‌ها، کنیدیوم و کنیدیوفور در جدایه‌ها مشاهده شده بود تعیین توالی مناطق بیشتری از ژنوم قارچ و استفاده از آغازگرهای اختصاصی پیشنهاد شده است. همچنین شناسایی چندین گونه از جنس *Botrytis* توسط *میرزایی* و همکاران (Mirzaei *et al.*, 2008) صورت گرفت. *امین* و همکاران (Amin *et al.*, 2012) به بررسی فراوانی عناصر جهنده در جدایه‌های گونه *B. cinerea* پرداختند. این عناصر با نام Boty و Flipper در دو رده مجزا قرار دارند. دسته اول عناصری هستند که توسط رونویسی معکوس یک mRNA منتقل می‌شوند اما دسته دیگر در سطح DNA و با بریده‌شدن بخشی از DNA و جانشینی در مکانی دیگر منتقل می شوند. Boty یک قطعه ۶kb است که به‌صورت تکرارهای طویل انتهایی و به تعداد زیاد از توالی خاصی در طول ژنوم مشخص می‌شود. قطعه Flipper، ۱۸۴۲bp بوده و به تعداد ۲۰ نسخه در هر ژنوم وجود دارد. این عناصر یکی از عوامل تفاوت ژنتیکی استرین‌ها در گونه *B. cinerea* هستند.

هدف از این تحقیق شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های جمع‌آوری شده قارچ *B. cinerea* از مزارع و گلخانه کشت هیدروپونیک توت‌فرنگی در استان کردستان با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی قارچ عامل کپک خاکستری

جدایه‌های عامل بیماری کپک خاکستری، از مزارع تحت کشت توت‌فرنگی استان کردستان، مزارع حومه شهرستان سنندج (به سمت کرمانشاه و مریوان) و گلخانه کشت هیدروپونیک توت‌فرنگی قروه، با نمونه‌برداری از میوه‌های آلوده و کشت بخش‌های مختلف بوته‌های دارای علائم بیماری در روی محیط‌کشت‌های غذایی، جداسازی شدند. به‌منظور شناسایی قارچ، تمام جدایه‌های بوتریتیس روی محیط PDA و در دمای ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ روز در روشنایی قرار داده شده و خصوصیات مورفولوژیکی قارچ ازجمله طول کنیدیوفور، ابعاد کنیدیوم و اسکلروت قارچ اندازه‌گیری شد. برای تهیه اسکلروت قارچ، محیط‌کشت حاوی قارچ در تاریکی و دمای ۸±۱ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. برای اندازه‌گیری، ابعاد (طول و عرض) ۵۰ کنیدیوم و طول ۳۰ کنیدیوفور (به‌عنوان پارامترهای شناسایی قارچ) در هر جدایه با بزرگ‌نمایی ۴۰ میکروسکوپ برای هر جدایه اندازه‌گیری شد و همچنین شکل و رنگ پرگنه قارچ، شکل کنیدیوم و شکل، رنگ، و نحوه توزیع اسکلروت‌های قارچ روی محیط PDA مشاهده و بررسی شد. خصوصیات مورفولوژیکی طبق کلید شناسائی *الیس* (Ellis, 1971) مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی‌های مولکولی

استخراج DNA

قبل از استخراج DNA جدایه‌ها در محیط‌کشت مایع عصاره مالت (MEB) کشت داده شدند. سپس ارلن‌های حاوی جدایه‌ها به شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه منتقل شدند. بعد از مدت

۱۰ تا ۱۴ روز، محیط مایع با استفاده از میکروپور و پمپ خلاء صاف شده و میسلیوم‌های به‌دست آمده در میکروتیوب قرار داده شدند و تا زمان استخراج DNA، در فریزر با دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. لازم به ذکر است که این قارچ به‌دلیل تولید پلی‌ساکاریدهای فراوان در محیط‌کشت، دارای آلودگی‌های بسیار زیادی است و روش استخراج DNA و انجام مراحل آن به‌دقت عمل بسیار زیادی نیاز دارد. به همین منظور از روش استخراج DNA به روش *موری و تامسون* (Murray and Thompson, 1980) استفاده شد و کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش‌اسپکتروفتومتری بررسی شد.

تشخیص اختصاصی گونه

جهت تشخیص اختصاصی گونه *B. cinerea* از آغازگر C729 مورد استفاده توسط *ریگوتی* و همکاران (Rigotti *et al.*, 2006) استفاده شد. محلول پایه برای یک واکنش به میزان ۲۵ میکرولیتر در واکنش PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی مطابق مواردی که در ادامه می‌آید تهیه گردید: آب دوبار تقطیر سترون ۱۳ میکرولیتر، بافر PCR ۲/۵ میکرولیتر، کلریدمنیزیم ۱/۲۵میکرولیتر، dNTPs ۰/۵ میکرولیتر، آغازگرها Reverse (Forward) ۲/۵میکرولیتر، (۱۲.۵Pmol/µl)، آنزیم*Taq* DNA پلیمراز ۰/۲۵ µl (۴Unit)، ابتدا ۱ میکرولیتر DNA مربوط به هر نمونه در داخل میکروتیوب‌های مخصوص PCR ریخته شده و در یخچال نگهداری شد. بلافاصله محلول پایه تهیه شده و ۲۴ میکرولیتر از آن به میکروتیوب حاوی DNA اضافه گردید. از دستگاه ترموسایکلر شرکت Techn مدل TC-512 جهت تکثیر استفاده گردید. مطابق برنامه داده شده به دستگاه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بر اساس یک چرخه واسرشت اولیه ۲ دقیقه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه واسرشت ۳۰ ثانیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال ۳۰ ثانیه ۶۰ درجه سانتی‌گراد، گسترش ۹۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه گسترش نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. از آغازگرهای اختصاصی C729+ (5'-AGCTCGAGAGAGATCTCTGA-3') و C729- (5'-CTGCAATGTTCTGCGTGGAA-3') استفاده شد.

انجام RAPD-PCR

در این مطالعه به‌منظور انجام RAPD-PCR از ۱۱ آغازگر تصادفی، مورد استفاده برای تعیین تنوع ژنتیکی در جمعیت جدایه‌های *B. cinerea* توسط *آلفونسو* و همکاران (2000)، استفاده شد.

برای تهیه یک واکنش به حجم نهایی ۴۵ میکرولیتر، ۵ میکرولیتر بافر PCR(10x)، ۲/۵ میکرولیتر کلریدمنیزیم (۲/۵mM)، ۱ میکرولیتر dNTPs (۰/۲mM)، آغازگر ۵ میکرولیتر (۱۰Pmol/µl)، آنزیم *Taq* DNA پلیمراز، ۰/۶ میکرولیتر (۴unit)، آب مقطر استریل ۳۰/۹ میکرولیتر استفاده شد. در ابتدا ۵ میکرولیتر DNA مربوط به هر نمونه در داخل میکروتیوب‌های مخصوص PCR ریخته شده و به یخچال منتقل شد. بلافاصله محلول پایه تهیه شده و ۴۵ میکرولیتر از آن به هر میکروتیوب حاوی DNA اضافه گردید. از دستگاه ترموسایکلر شرکت Techn مدل TC-512 جهت تکثیر PCR استفاده گردید. مطابق برنامه داده شده به دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگر تصادفی براساس یک چرخه واسرشت اولیه به‌مدت چهار دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه شامل مرحله واسرشت ۱ دقیقه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال ۱ دقیقه ۴۶ درجه سانتی‌گراد، مرحله گسترش ۲ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد، و یک چرخه گسترش نهایی ۵ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در آخرین چرخه حرارتی و پس از مرحله گسترش نهایی، دمای ترموسایکلر در دمای چهار درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت تنظیم گردید که این حالت موجب حفظ و نگهداری محصول PCR می‌شود. محصول PCR را می‌توان در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت چند روز نگهداری نمود تا در فرصت مناسب، آن را الکتروفورز کرد. نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول (۱) ذکر شده است.

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در RAPD-PCR

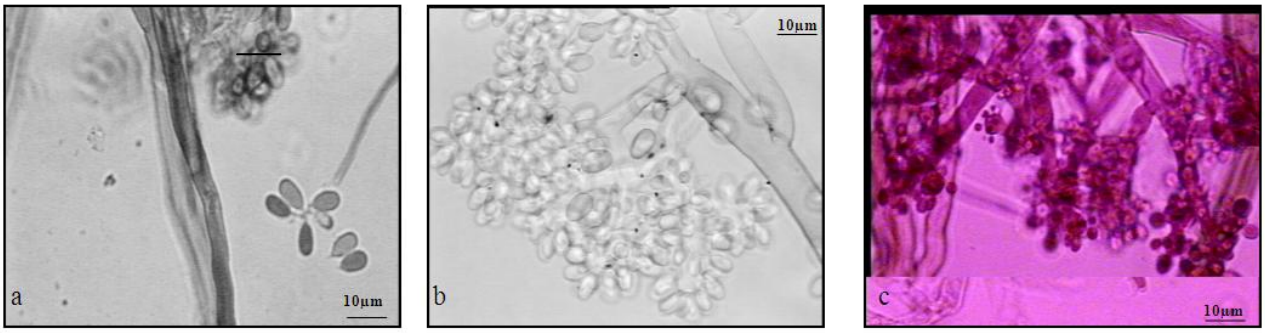
Table 1: Primers Sequences used in RAPD-PCR

آغازگر sequences	توالی Primers
OPD-02	5'GGACCCAACC3'
OPB-01	5'GTTTC GCTCC3'
OPB-03	5'CATCCCCCTG3'
OPB-04	5'GGACTGGAGT3'
OPB-05	5'TGCGCCCTTC3'
OPB-08	5'GTCCACACGG3'
OPB-10	5'CTGCTGGGAC3'
OPB-13	5'TTCCCCCGCT3'
OPB-15	5'GGAGGGTGTT3'
OPB-18	5'CCACAGCAGT3'
OPB-20	5'GGACCCTTAC3'

نتایج

شناسایی مورفولوژیکی قارچ *B. cinerea*

در زمینه خصوصیات شکل‌شناسی قارچ از کلید قارچ‌های ناقص ارایه شده توسط *الیس* (1971) استفاده شد و با نتایج حاصل از تحقیق *میرزایی* و همکاران (2008) مقایسه شد. در جدایه‌های جمع‌آوری شده، فرم‌های رشد با اسپوردهی و رشد میسلیومی متفاوت دیده شد. اسکلروت‌ها در اندازه‌های متفاوت، سیاه‌رنگ، یا تیره و به رنگ سبز لجنی به‌طور مجتمع در یک بخش از محیط‌کشت، به‌صورت دوایر متحدالمرکز و یا منظم روی یک دایره، یا به‌طور پراکنده و نامنظم، در محیط‌کشت تشکیل شد. کنیدیوفورها منشعب و باریک، شفاف و در انتها بی‌رنگ بودند. هیف‌های قارچ صاف، قهوه‌ای رنگ و گاهی در برخی از جدایه-ها، در نقاطی از هیف فرورفتگی وجود داشت. همچنین در برخی از جدایه‌ها تولید ماده زردرنگ در محیط کشت دیده شد. ضخامت کنیدیوفورها به‌طور متوسط ۲۶/۲۴ (۲۹-۱۱) میکرومتر بود. طول کنیدیوفورها به‌طور متوسط ۱۲۶۹ میکرومتر و کنیدیوم‌ها به رنگ روشن تا قهوه‌ای بودند. متوسط ابعاد کنیدیوم‌ها در جدایه‌ها ۸/۶۹×۶/۷۶ (۱۳/۲۳×۸/۸۲) میکرومتر بود (شکل۱، a). طبق خصوصیات مورفولوژیکی، جدایه‌های موجود *B. cinerea* شناسایی شدند.



شکل ۱: کنیدیوم و کنیدیوفورهای *B. cinerea*، a: کنیدیوم‌های منفرد و آزاد همراه با زائده انتهایی متصل به کنیدیوم (hilum) b و c: دستجات کنیدیوم بر روی وزیکول متورم انتهایی کنیدیوفور؛ کنیدیوفور و ریسه قارچ

Fig. 1: Conidium and conidiophores of *B. cinerea*, a: free single conidia with continous hilum at the end of conidium, b,c: conidia group on swollen apex of conidiophores;conidiophores and mycelium

شناسایی مولکولی قارچ *B. cinerea*

آغازگر C729 طبق مطالعات *ریگوتی* و همکاران (2005) و *میرزایی* و همکاران (2008) یک قطعه ۷۰۰bp را که مختص گونه *B. cinerea* است تکثیر می‌کند.

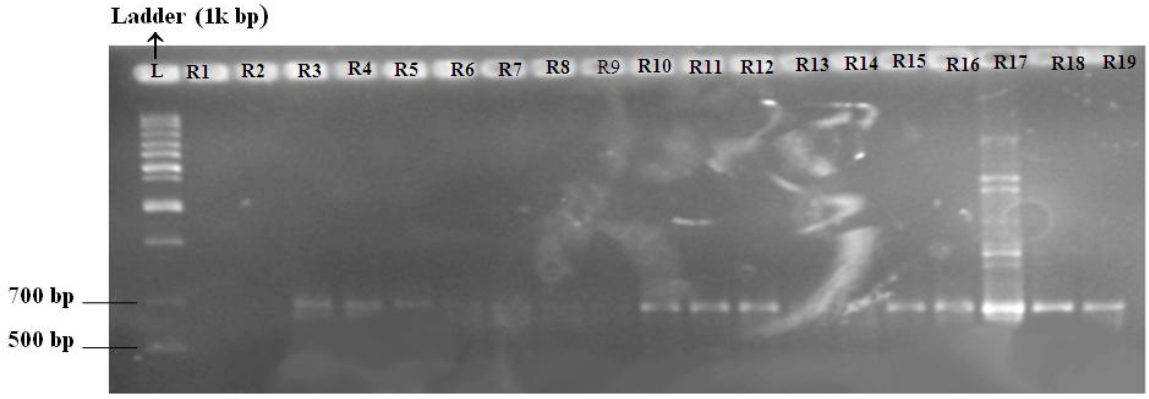
در ۱۹ جدایه مورد آزمایش با استفاده از آغازگر اختصاصی C 729، دو جدایه ۱ و ۲ باند نداشتند، جدایه ۱۷ علاوه‌بر این باند باندهای کاذب دیگر را هم تکثیر کرد و سایر جدایه‌ها باند ۷۰۰ جفت بازی را به‌صورت تک باند تکثیر کردند (شکل ۲). برای سه جدایه ۱، ۲ و ۱۷ واکنش PCR با آغازگر موردنظر با دو تکرار مجددا انجام شد و هر سه جدایه باند۷۰۰ جفت بازی را تکثیر کردند. با توجه به اینکه این قارچ به‌دلیل تولید پلی ساکارید در محیط‌کشت آلودگی‌های فراوانی تولید کرده و همواره باید از کشت کاملاً تازه قارچ در محیط‌های با مواد غذایی حداقل برای رشد قارچ در کشت‌های اولیه قبل از کشت در محیط مایع، برای استخراج DNA استفاده کرد و تمام مراحل استخراج باید به‌دقت انجام شود لذا انجام PCR با آغازگرهای اختصاصی معمولا حساس و گرفتن باند موردنظر از تمام جدایه‌ها همزمان با همچنان که در تصویر نیز مشخص است دقت و تکرار بیشتری لازم دارد. لازم به ذکر است که از بین بافرهای استخراج زیادی که تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند، تنها بافر ذکر شده در این تحقیق مناسب بود.

نتایج آزمایش RAPD و تجزیه داده‌ها

تجزیه و تحلیل نتایج مولکولی RAPD براساس باندهای چند شکل روی جدایه‌های *B. cinerea* و طبق میزان تشابه بین افراد با روش تجزیه خوشه‌ای براساس روش UPGAM و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از نرم‌افزار NTSYS *رولف* (Rohlf, 1998) انجام گرفت. با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای به روشUPGAM و ضریب تشابه جاکارد، ضریب همبستگی بالای ۹۸ درصدی (r= 0.98) به‌دست آمد. از ۱۱ آغازگر مورد استفاده در آزمایش RAPD، آغازگر OPB-10 بیشترین تعداد باند و آغازگر OPB-8 کمترین تعداد باند را داشتند (شکل‌های ۳ و ۴). در مجموع از ۱۱ آغازگر، ۱۲۳ باند در محدوده ۳۰۰۰-۲۵۰ جفت باز به‌دست آمد که دارای چندشکلی بودند.

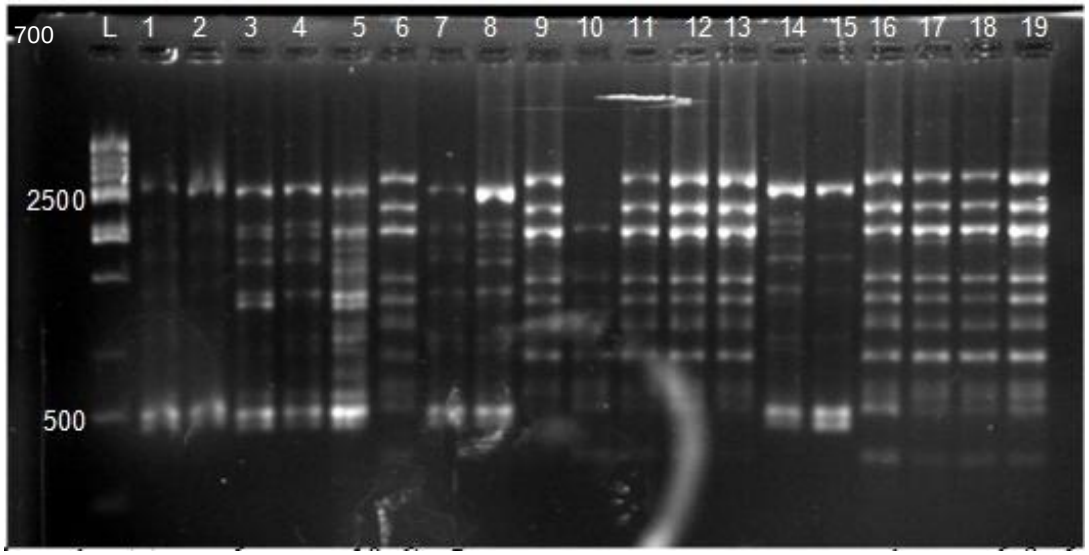
از میان آغازگرهای مورد استفاده، آغازگرهای OPB-02، OPB-04، OPB-05 و OPB-10 تمایز جدایه‌ها را بهتر نشان دادند. با توجه به باندهای به‌دست آمده از آزمایشات RAPD، جدایه‌های مختلف *B. cinerea* با یکدیگر مقایسه شدند و همان‌طورکه در شکل ۵ ملاحظه می‌شود در حدود ۴۵ درصد شباهت جدایه‌ها به چهار دسته اصلی تقسیم می‌شوند.

جدایه‌های R1، R2، R3، R4، R5، R6، R7 جدایه‌های جمع‌آوری شده از گلخانه و سایر جدایه‌ها از مزارع مذکور جمع‌آوری شدند. جدایه R6 جدایه نمونه‌برداری شده از گلخانه بوده که در گروه اول قرار نمی‌گیرد و با آنها شباهت بسیار کمی دارد. جدایه‌های R10، R11، R13، R16، R17، R19 از مزارع مختلف حومه به سمت استان کرمانشاه از جمله روستای ماسان و سایر مزارع در این مسیر جداسازی شدند. جدایه‌های R8، R9، R12، R14، R15، R18 از مزارع حومه استان در محور سنندج- مریوان جمع‌آوری شدند.



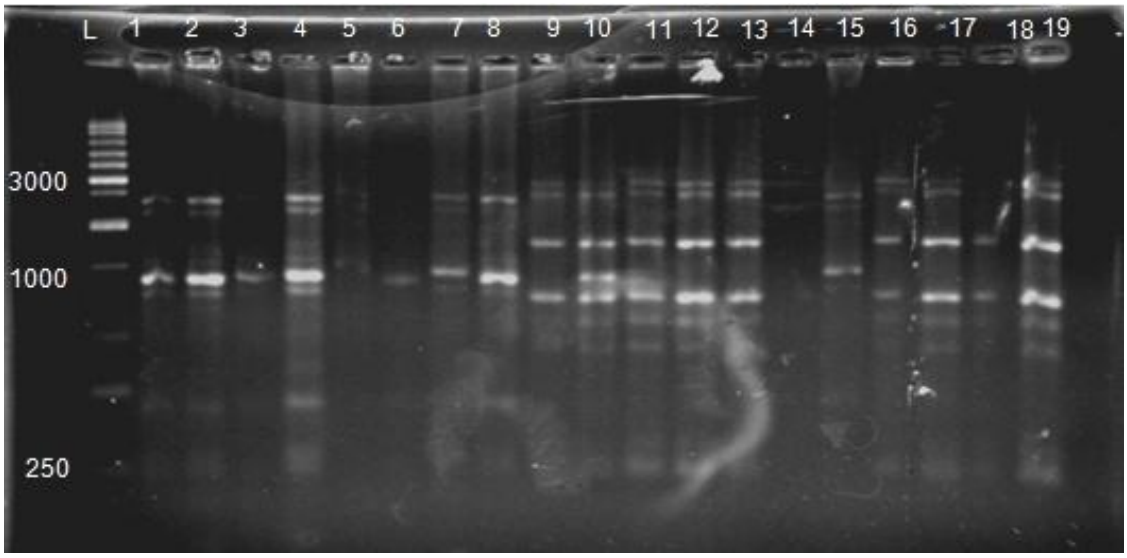
شکل ۲: محصول واکنش PCR جدایه‌های قارچ *B. cinerea* با آغازگر اختصاصی C 729 در ژل آگارز یک درصد، R1 تا R19 شماره‌ی جدایه‌های مختلف قارچ *B. cinerea* می‌باشد. L : مارکر

Fig. 2: PCR amplified product on 1% agrose gel with C729 primers , L: 1kbp ladder R1 to R19 are *B. cinerea* isolates



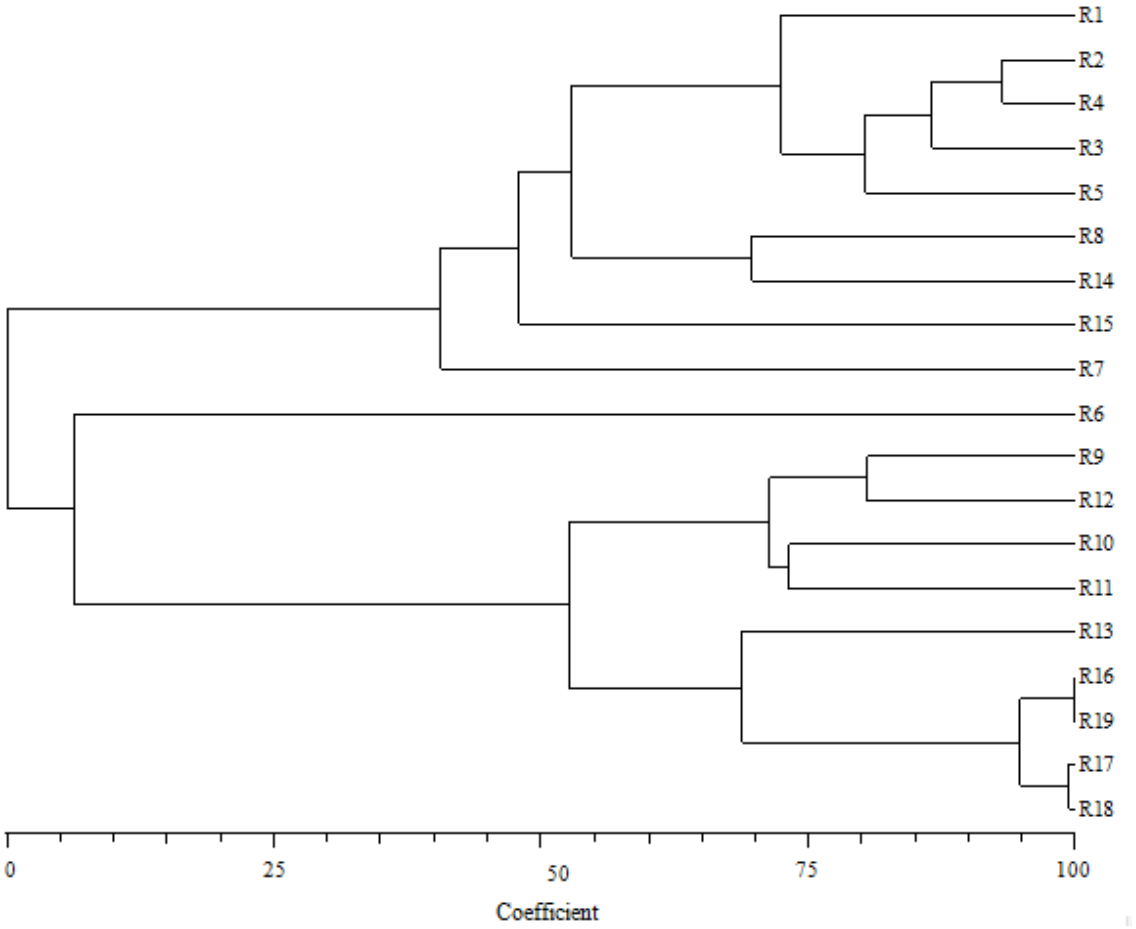
شکل ۳: نتیجه واکنش RAPD با استفاده از آغازگر OPB–10. (L): مارکر kb ۱، ۱ تا ۱۹ DNA جدایه‌های مختلف قارچ *B. cinerea*.
R1-1، R2-2، R3-3، R4-4، R5-5، R6-6، R7-7، R8-8، R9-9، R10-10، R11-11، R12-12، R13-13، R14-14، R15-15، R16-16، R17-17، R18-18، R19-19

Fig. 3: PCR product of RAPD-PCR with primer OPB-10, 1 to 19 numbers are DNA of *B. cinerea* isolates, L: ladder is 1kbp



شکل ۴: محصول واکنشRAPD جدایه‌های قارچی با استفاده از آغازگر OPB-08. ۱ تا ۱۹ DNA جدایه‌های مختلف قارچ *B. cinerea*.
(L): مارکر kb ۱، R1-1، R2-2، R3-3، R4-4، R5-5، R6-6، R7-7، R8-8، R9-9، R10-10، R11-11، R12-12، R13-13، R14-14، R15-15، R16-16، R17-17، R18-18، R19-19

Fig. 4: PCR product of RAPD-PCR with primer OPB-10, 1 to 19 numbers are DNA of *B. cinerea* isolates, L: ladder is 1kb



شکل ۵: دندروگرام ترسیم شده با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGAM برای جدایه‌های *B. cinerea* با استفاده از نرم‌افزار NTSYS

Fig. 5: Dendrogram of isolates were drawn by UPGAM clustering method with NTSYS software

بحث

روش‌های کلاسیک برای شناسایی گونه‌های *Botrytis* و تاکسونومی این جنس متکی بر خصوصیات مورفولوژیکی قارچ بوده است و تاکسونومی و طبقه‌بندی این قارچ ابتدا براساس خصوصیات مورفولوژیکی همراه با اختصاص میزبان بود (*جرویس*، 1977). با این حال خصوصیات مورفولوژیکی تحت تأثیر شرایط محیطی تغییر کرده و سودمند بودن آنها مورد تردید است. هیچ کلید جامعی برای همه گونه‌های این جنس در دسترس نبوده و تشخیص گونه‌ها بر اساس روش‌های مرسوم گذشته چندان قطعی نیست *نیلسن* و همکاران (Nielsen *et al.*, 2001). *منزینگر* (Menzinger, 1966) طبقه‌بندی گونه‌های *Botrytis*را مرور کرده و نشان داد که چگونه شرایط کشت می‌تواند خصوصیات طبقه‌بندی را به‌طور قابل توجهی تغییر دهد از جمله ابعاد کنیدیوم، فرم و خصوصیات کلنی و شکل کنیدیوم که با تغییر دما و محیط‌کشت تغییر می‌کند اگرچه تغییرات محیطی قابل برگشت است با وجود این خصوصیات مورفولوژیکی تاکنون همچنان در طبقه‌بندی *Botrytis* مورد استفاده بوده و در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی نیز در تشخیص گونه‌های بوتریتیس استفاده شده است.

تفاوت در منطقه ITS در DNA ریبوزومی برای تشخیص گونه‌ها بسیار سودمند است اما در جنس *Botrytis* تفاوت در این ناحیه کم بوده و برای طراحی آغازگر اختصاصی مناسب نیست. بنابراین آغازگرهای اختصاصی وجود دارندکه در ردیابی و شناسایی *B. cinerea* استفاده می‌شوند *اوتخد و ماتور*؛ *نیلسن* و همکاران، 2001 (Utkhede and Mathur, 2002). در ایران در استان همدان برای اولین بار قارچ *B. cinerea* از مزارع انگور جداسازی شده و به‌منظور شناسایی گونه موردنظر از ویژگی‌های مورفولوژیکی استفاده شد و همچنین به‌منظور قطعیت بیشتر در شناسایی گونه در جدایه‌ها بررسی مولکولی با استفاده از توالی‌یابی نواحی ITS1 و ITS2 و توالی ۵/۸S DNA ریبوزومی انجام شد. اما با توجه به تفاوت زیادی که در شکل و اندازه اسکلروت‌ها، کنیدیوم و کنیدیوفور در جدایه‌ها مشاهده

شده بود تعیین توالی مناطق بیشتری از ژنوم قارچ و استفاده از آغازگرهای اختصاصی پیشنهاد شده است. همچنین شناسایی چندین گونه از جنس *Botrytis* توسط *میرزایی* و همکاران (2008) صورت گرفت. تعداد ۳۶۳ جدایه از قارچ *Botrytis* از سراسر ایران جمع‌آوری شده و به کمک خصوصیات مورفولوژیکی و اختصاص میزبانی و ویژگی‌های محیط‌کشت قارچ ، هشت گونه *Botrytis* شناسایی شدند. شناسایی مولکولی گونه‌ها به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آغازگرهای اختصاصی انجام شد. شناسایی گونه *B. cinerea* در بین جدایه‌ها به کمک ویژگی‌های مورفولوژیکی و ارتباط میزبانی و آغازگرهای اختصاصی طراحی شده صورت گرفت.

در این تحقیق به‌منظور تأیید قطعی و اطمینان از شناسایی گونه قارچ موردنظر، با استفاده از روش مولکولی و آغازگرهای اختصاصی C729، ۱۹ جدایه مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج این بررسی با مطالعات *ریگوتی* و همکاران (2006) و *میرزایی* و همکاران (2008) مطابقت داشت. این جدایه‌ها با توجه به خصوصیات مورفولوژیکی و انجام آزمایش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه، به‌عنوان گونه *B. cinerea* شناسایی شدند.

آلفونسو و همکاران (2000) تنوع ژنتیکی زیرمجموعه‌هایی از جدایه‌های *B. cinerea* را با استفاده از آغازگرهای مشابه از دو منطقه از جنوب شرقی اسپانیا، جمع‌آوری شده از گلخانه‌های مختلف، با استفاده از آزمون RAPD تعیین کرده و مقایسه جدایه‌ها را در سطوح گلخانه، منطقه و بین منطقه‌ای انجام دادند. بیشترین تنوع ژنتیکی در پایین‌ترین زیر تقسیم‌های جمعیتی در بین جمعیت‌های داخل گلخانه‌ها مشاهده شد و کمترین تنوع در سطح منطقه‌ای بود. در نتایج این آزمون فرضیه اسپورهای هوازاد بوتریتیس و انتقال ژن‌های قارچ در سطح منطقه و مسافت‌های دورتر (شارش ژن)، نیز مطرح شده است. یافته‌ها حاکی از این است که جمعیت‌های *B. cinerea* از لحاظ ژنتیکی بسیار متفاوت هستند و ارتباط بیولوژیکی یا میزبانی خاصی با خصوصیات ژنتیکی قارچ مشاهده نشده است.

در ایران تحقیقات کمتری بر روی گونه *B. cinerea* صورت گرفته است (*میرزایی* و همکاران، 2008؛ *امین* و همکاران، 2012). در تحقیقی که توسط *میرزایی و* همکاران (2009) در ایران صورت گرفت آزمون RAPD به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی بر روی ۴۵ جدایه جمع‌آوری شده از میزبان‌های مختلف انجام شد. در نتایج این آزمون چهار گروه متمایز در بین جدایه‌ها تشخیص داده شد. گروه‌بندی موردنظر هیچ ارتباطی با منشاء جغرافیایی قارچ یا زمان نمونه‌برداری قارچ نداشت اما جدایه‌های مربوط به هر میزبان در یک گروه مجزا قرار گرفتند. در نتایج آزمایش احتمال ایجاد اختصاص میزبانی در مزرعه گزارش شده است.

در نتایج حاصل از انجام PCR- RAPD در این مطالعه، دندروگرام به‌دست آمده جدایه‌ها را به ۴ دسته اصلی تقسیم نمود، به‌طوری‌که دسته اول (جدایه‌های جمع‌آوری شده از گلخانه) با ضریب تشابه ۴۱٪ شباهت در یک گروه و جدایه‌های نمونه‌برداری شده از مزارع مختلف در دو گروه متفاوت با ضریب تشابه ۵۳٪ قرار گرفتند. جدایه R۶ یک جدایه‌ی گلخانه‌ای است که در یک گروه مجزا قرار گرفته و با هر دو گروه شباهت بسیار کمی دارد. جدایه‌های R1، R2، R3، R4، R5، R6، R7 شامل جدایه‌های جمع‌آوری شده از گلخانه و سایر جدایه‌ها از مزارع مذکور جمع‌آوری شدند. R10، R11، R13، R16، R17، R19 از مزارع مختلف حومه به سمت استان کرمانشاه ازجمله روستای ماسان و سایر مزارع در این مسیر جداسازی شدند. جدایه‌های R8، R9، R12، R14، R15، R18 از مزارع حومه استان به سمت مریوان جمع‌آوری شدند. این جدایه در آزمون بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفته و کمترین شدت بیماری‌زایی را نسبت به گروه جدایه‌های مزرعه نشان داد. همچنین در این جدایه در بررسی خصوصیات مورفولوژیک نسبت به سایر جدایه‌ها کنیدیوم‌ها ابعاد بزرگ‌تری داشت اما از این نظر نزدیکی و شباهت بیشتری به جدایه‌های مزارع در دو گروه در نمودار داشت. چنان‌که مشاهده می شود جدایه‌های R14 و R15 (نمونه برداری شده از مزارع حومه استان) در گروه اول قرار گرفته و با جدایه‌های جمع‌آوری شده از مزارع نزدیک به خود از لحاظ مکان جغرافیایی تفاوت بیشتری نشان می‌دهند. با ارزیابی چشمی الگوی باندها نیز این تفاوت مشاهده می شود. جدایه R18 و R12 که از مزارع نزدیک‌تر به هم از لحاظ جغرافیایی نمونه‌برداری شدند در دو گروه جداگانه قرار گرفته و در تقسیم‌بندی‌های کوچک‌تر با جدایه‌های مزارع دیگر گروه‌بندی شده و با یکدیگر شباهت کمتری نشان دادند. همچنین جدایه‌های R8 و R9 که از مزارع نزدیکتر جمع‌آوری شدند هر کدام در گروهی جداگانه قرار می‌گیرند. با استفاده از آغازگرهای بیشتر تنوع جدایه‌ها بهتر ارزیابی شد. با توجه به نتایج حاصل از آزمایش و رسم نمودار، مشاهده می‌شود که با وجود قرار گرفتن دسته‌بندی جدایه‌های گلخانه در یک گروه و جدایه‌های نمونه‌برداری شده از مزارع مختلف در گروه‌های دیگر، جدایه R6 گلخانه در گروه اول قرار نمی‌گیرد همچنین جدایه‌های مزارع دور از هم با جهت جغرافیایی متفاوت گاهاً مشاهده می‌شود که شباهت بیشتری نسبت به جدایه‌های

نزدیک‌تر به خود دارند ازجمله جدایه R18 که با جدایه‌های R12، R14 و R15 که از مزارع نزدیک‌تر به هم جدا شده‌اند تفاوت بیشتر و با جدایه‌هایR16، R17 و R19 در تقسیم‌بندی کوچک‌تر قرار گرفته و شباهت بیشتری نشان می‌دهد. لذا این احتمال وجود دارد که گروه‌بندی ایجاد شده در ابتدای کار ناشی از تعداد کم جدایه‌ها در تحقیق حاضر باشد چنان‌که مشاهده شده است در میان جدایه‌های گروه اول جدایه‌های جمع‌آوری شده از مزارع را در نمودار می‌توان مشاهده کرد همچنین جدایه ۶ از گلخانه را در خارج از گروه اول می‌بینیم.

در بررسی نتایج همچنین مشاهده شد که بعضاً جدایه‌های مزارع دور از هم شباهت بیشتری به جدایه‌های نزدیک خود از لحاظ جغرافیایی داشته‌اند و یا جدایه‌هایی که از مزارع نزدیک به هم جداسازی شدند تنوع زیادی را نشان می‌دهند که با در نظر گرفتن نتایج حاصل از سایر تحقیقات و مطالعات مشابهی که در این زمینه صورت گرفته است دور از انتظار نیست و می‌توان با انجام دادن تحقیق و بررسی بیشتر در این خصوص به نتایج قطعی‌تر دست یافت.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۲-۱ متن انگلیسی مراجعه شود.