مطالعه‌ی ساختار جمعیتی قارچ *Gnomonia leptostyla* عامل بیماری آنتراکنوز گردو در استان آذربایجان‌شرقی به روش PCR-RFLP

سیامک صلاحی[۱]، محمد جوان نیکخواه[۲] و سلیمان جمشیدی[۳]

چکیده

بیماری آنتراکنوز گردو یکی از مهمترین عوامل مهم خسارت‌زا به درختان گردو در نواحی مختلف دنیا و شایع‌ترین بیماری درختان گردو در مناطق مختلف گردوکاری ایران از جمله استان‌های شمالی، کرمانشاه، آذربایجان، خراسان، سمنان و کرج می‌باشد. در این تحقیق طی سال‌های ۸۴ و ۸۵ نمونه‌های برگی آلوده از مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی جمع آوری گردید. ۶۰ جدایه تک اسپور شده از قارچ عامل بیماری جهت مطالعه ساختار جمعیتی قارچ عامل بیماری بر اساس انگشت نگاری DNA به کمک تکنیک PCR-RFLP مورد مطالعه قرار گرفت. استخراج DNA قارچ با استفاده از روش Rapid Mini-Preparation از پودر میسلیومی قارچ انجام شد. برای انجام PCR از دو جفت آغازگر طراحی شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی زیر واحد 18s-SrDNA و ناحیه ITS ریبوزومی استفاده گردید. قطعات تکثیر شده تحت تأثیر آنزیم های برشی قرار گرفتند. از بین آنزیم های اندونوکلئازی مورد استفاده، سه آنزیمDra I، Sma I و Bsu II در ناحیهSrDNA و آنزیم‌های Hinf I، Hind III در ناحیه ITS موفق به برش قطعات گردیدند. نتایج نشان داد که از میان قطعات برش داده شده توسط آنزیم‌های برشی، الگوی پدید آمده روی ژل آگارز برای کلیه جدایه‌های مورد استفاده یکسان بوده و در حقیقت به نوعی همولوژی در ساختار جمعیتی این قارچ می‌توان تصور نمود.

واژه‌های کلیدی: آنتراکنوز گردو، تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیتی، قارچ، بیماری

۱ – کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه Siamaksalahi@yahoo.com

۲ – عضو هیأت علمی گروه گیاه پزشکی دانشکده باغبانی و گیاهپزشکی پردیس کشاورزی کرج، دانشگاه تهران

۳- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه

مقدمه و بررسی منابع

بیماری لکه سیاه یا آنتراکنوز گردو در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۳۱ توسط خبیری گزارش شد. این بیماری در نواحی شمال کشور از جمله مازندران و گرگان، آذربایجان شرقی و غربی، کرمانشاه، خراسان، سمنان، قزوین، کردستان و استان‌های مرکزی انتشار دارد (۱و۲).

خسارت بیماری در باغات گردوی استان آذربایجان شرقی همواره قابل توجه بوده به‌طوری که در برخی از سال‌ها و برخی نواحی، اکثر درختان گردو شدیداً به این بیماری مبتلا شده‌اند (۱). این بیماری همچنین از مناطق مختلف دنیا از جمله آمریکای شمالی، آسیا، قسمت هایی از اروپا مانند فرانسه، بلغارستان، ترکیه، یونان، ایتالیا و غیره گزارش شده است (۲). عامل این بیماری قارچ *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & de Not. با فرم غیرجنسی *Marssonina juglandis* (Lib.) Sacc. می‌باشد. زمستان‌گذرانی قارچ اغلب به صورت پریتسیوم در سطح پشتی برگ‌ها و گاه میوه‌های ریخته شده در پای درخت و نیز زخم‌های روی شاخه‌های یکساله صورت می‌گیرد (۱ و۳).

قارچ‌ها دارای ساز و کارهای مختلفی در ایجاد تغییر ژنتیکی در چرخه زندگی خود از طریق تولیدمثل جنسی یا غیرجنسی هستند. نتایج تغییرپذیری در قارچ‌ها از چند نظر دارای اهمیت است. این تغییرات می تواند ارتباط بیمارگر با میزبان خود را تا حدود زیادی تحت تأثیر قرار دهد. تنوع‌پذیری ژنتیکی به قارچ ها امکان می‌دهد تا به راحتی با تغییرات شرایط محیطی خود و یا با ورود ژنوتیپ های جدید گیاهی با میزبان خود سازگار شوند. برای پیشگیری و مبارزه با بیماری‌های قارچی گیاهان، مطالعه جنبه های بیولوژی ملکولی و شناخت ساختار جمعیتی آنها بسیار مهم است. در این زمینه استفاده از روش‌های ملکولی به ویژه انگشت نگاری DNA مفید خواهد بود (٤ و٥). در واقع، انگشت نگاری DNA شناسایی به موقع جمعیت بیمارگر برای جمعیت میزبان و نیز بررسی نحوه تغییرپذیری جمعیت‌ها را ممکن می‌سازد. تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی و روابط درون یا بین جمعیت‌ها، ابزار اصلی بسیاری از روش‌های علم بیولوژی محسوب می‌شود (۵). توالی های rDNA در مورد تعداد زیادی از یوکاریوت‌ها شناخته شده است و این اجازه را می‌دهد که آغازگرهای ویژه یک گونه خاص، جنس یا خانواده، طراحی شوند (۱۱ و ۱۲). در خصوص تعیین تنوع ژنتیکی *G. leptostyla* تحقیقات بسیار اندکی صورت گرفته است. بلیساریو و همکاران (۱۹۹۹) با استفاده از تکنیک ملکولی PCR-RFLP، وجود تنوع ژنتیکی در جدایه‌های جمع آوری شده از ایتالیا را مورد بررسی قرار دادند. در طی این تحقیق نواحی کدکننده برای زیر واحدهای کوچک ریبوزومی و نواحی ITS مورد بررسی قرار گرفتند و پلی مورفیسم بین جدایه‌های مورد مطالعه یافت نشد (۱۳).

هدف از این تحقیق دستیابی به اطلاعاتی از ساختار ژنتیکی این قارچ و معرفی تنوع احتمالی جمعیت‌های موجود در منطقه برای بکارگیری در برنامه‌های به‌نژادی و واکنش ارقام و نیز مدیریت کنترل بیماری بود.

مواد و روش ها

طی سال های ۱۳۸٤ و ۱۳۸۵، نمونه‌های برگی آلوده به قارچ عامل بیماری آنتراکنوز از باغات

گردوی استان آذربایجان شرقی از جمله شهرهای میانه، مراغه، تبریز، مرند، اسکو، عجب شیر، اهر، کلیبر و خسروشهر، از درختان گردو برداشت گردید. برای جداسازی جدایه‌ها، نمونه‌های برگی آلوده به مدت دو ساعت در زیر آب روان قرار داده شده و ضدعفونی سطحی آنها با محلول هیپوکلریت سدیم ١ درصد به مدت یک دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. برگ‌ها پس از رطوبت‌زدایی بر روی کاغذ صافی استریل، به قطعاتی به اندازه تقریبی یک‌سانتی‌متر مربع بریده شده و به تشتک‌های پتری حاوی محیط‌های کشت مصنوعی OMA منتقل شدند. ٦٠ جدایه قارچی پس از خالص‌سازی به روش تک اسپور، بر روی کاغذ صافی کشت و در دمای ٢٠- درجه‌ی سانتی‌گراد برای استفاده‌های آتی نگهداری شدند.

جهت آماده سازی میسلیوم قارچ و استخراج قطعات، کاغذ صافی حاوی هر یک از جدایه‌ها بر روی محیط غذایی OMA حاوی ٥٠ میلی‌گرم در لیتر سولفات استرپتومایسین کشت شدند. سپس جدایه‌ها به محیط کشت مایع PDB[1] منتقل شدند. کشت‌ها به مدت پنج روز در دمای ٢٢ درجه سانتی‌گراد روی شیکر انکوباتور قرار گرفتند.

استخراج DNA به روش Rapid Mini-Preparation ارایه شده توسط لیو و همکاران (٢٠٠٠) با اندکی تغییر انجام شد (١٤). برای حصول اطمینان از موفقیت در استخراج DNA و نیز جهت تعیین غلظت DNAی استخراج‌شده، سه میکرولیتر از محلول DNA با یک میکرولیتر بافر نمونه (٠/٢٥٪ بروموفنل بلو و ٤٠٪ ساکارز در آب مقطر دیونیزه شده) مخلوط گردید. دو میکرولیتر از این مخلوط از ژل آگارز ١٪ عبور داده شد. برای انجام PCR از دو جفت آغازگر طراحی شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی زیر واحد 18s-SrDNA و ناحیه ITS ریبوزومی (تهیه شده از شرکت MWG-Biotech) استفاده گردید (١٥).

تکثیر DNA در حجمی معادل ٥٠ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR انجام گردید. مقادیر وزنی هر یک از مواد شامل ١/٦ میکرولیتر از هر آغازگر، ٣٦ نانوگرم از DNA ژنومی، ٠/٤ میلی مول dNTPs (متشکل از غلظت‌های برابر dATP، dTTP، dCTP و dGTP)، ٢ میلی مول MgCl2، ٢/٥ واحد آنزیم Smart Taq DNA Polymerase در بافر ١٠x PCR بود. ضمن اینکه پنج واحد آنزیم معادل با یک میکرولیتر از آن بود. مولاریته dNTPs، ١٠ میلی‌مولار و مولاریته $MgCl_2$، ٥٠ میلی‌مولار بود.

ابتدا مواد فوق به جز DNA ژنومی در یک لوله ١/٥ میلی‌لیتری تمیز و استریل ریخته شده و به خوبی مخلوط گردید. برای احتیاط، در هر بار که این مخلوط تهیه می‌شد ١٠ درصد بیش از حجم مورد نیاز تهیه می‌شد. این مقدار بستگی به تعداد نمونه DNA در هر برنامه حرارتی PCR داشت. واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی[2] ITS1، ITS4، NS1 و NS8 در دستگاه Termal cycler مدل GP001، ساخت شرکت Corrbett Research استرالیا انجام گرفت. سیکل‌های حرارتی به شرح زیر بود. واسرشته سازی اولیه در دمای ٩٥ ^{o}C و به مدت زمان ٢ دقیقه و ٣٠ ثانیه

1- Potato Dextrose Broth

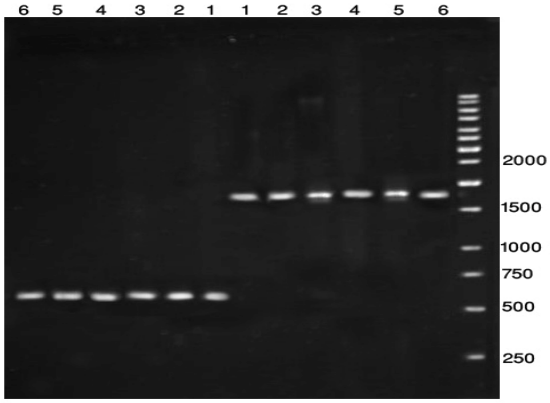
2- ITS1 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'
ITS4 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'
NS1 5'- GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3'
NS8 5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3'

صورت گرفت. در ادامه ۳۰ سیکل تکثیر شامل: واسرشته سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، هم سرشته سازی در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در۳۰ ثانیه و بسط DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و بالاخره بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. پس از انجام واکنش، محصول واکنش در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای دستیابی به میزان اختلاف توالی‌های rDNA، محصولات تکثیر یافته با استفاده از آنزیم های برشی، تحت بررسی و ارزیابی قرار گرفت (۷). ناحیه تکثیر شده ITS توسط آنزیم های اندونوکلئازی Hinf I, Hind III ،Hpa II, Sac I, Dra I, Bsu I هضم و برش داده شدند. ضمن این‌که آنزیم‌های برشی Alu 1, Bsu II, Msp I, Nar I, Dra I, Bgl II, Ecor و Sma I نیز جهت هضم قطعات تکثیر شده 18s مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام این کار، پس از تهیه بافرهای رقیق کننده و نگهدارنده مقدار ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از آنزیم‌ها با ۸/۵ میکرو لیتر از بافر مخصوص هر آنزیم مخلوط گردید. واکنش های هضم شامل یک میکرولیتر بافر ویژه هضم هر آنزیم، نتیجه واکنش PCR برای ٤٠ جدایه قارچ، تکثیر دو قطعه DNA شامل یک قطعه در حدود ۱۸۰۰ جفت باز که توسط آغازگرهای NS1 و NS8 تکثیر گردیده که تقریباً شامل کل طول SrDNA (SSU) می باشد. آغازگرهای ITS و ITS4 نیز قطعه ای به وزن ٦٠٠ جفت باز تکثیر نمودند. در واقع این آغازگرها موفق به تکثیر کل ناحیه ITS، شامل ژن 5.8s به‌علاوه قطعه کوچکی از زیر واحدهای کوچک و بزرگ rDNA گردیدند (شکل ۲). از مجموع ۸ آنزیم استفاده شده ۰/۵ میکرولیتر آنزیم برشی و پنج میکرولیتر محصول PCR از DNA ریبوزومی تکثیر شده به همراه ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه بود. واکنش‌ها سپس به مدت یک ساعت و نیم در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفتند. جهت ارزیابی محصولات هضم شده، در ژل حاوی آگاروز ۱ درصد و سیستم بافری IX TBE این محصولات عبور داده شدند. رنگ آمیزی نیز به مدت نیم ساعت در محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر) و بدنبال آن رنگبری در آب مقطر انجام شد و سپس توسط دستگاه Gel Document عکس برداری صورت گرفت. پس از آزمایش آنزیم‌های برشی فوق روی چند جدایه، آنزیم‌هایی که قادر به برش دادن قطعات بودند روی بقیه ٦٠ جدایه نیز استفاده شدند.

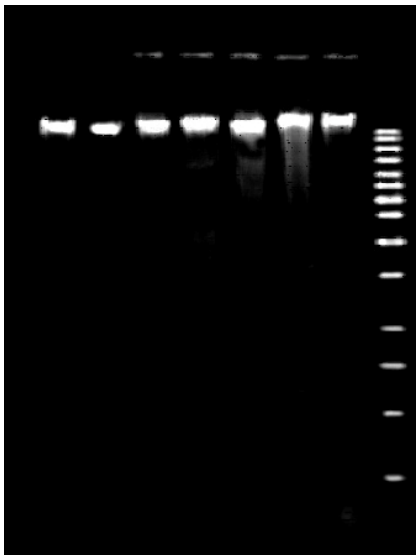
نتایج و بحث

DNA استخراج شده و حل شده در بافر TE از ژل آگارز یک درصد عبور داده شد تا از وجود DNA مطمئن گشته و غلظت آن تعیین شود (شکل۱).



شکل۱- تعیین غلظت DNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد

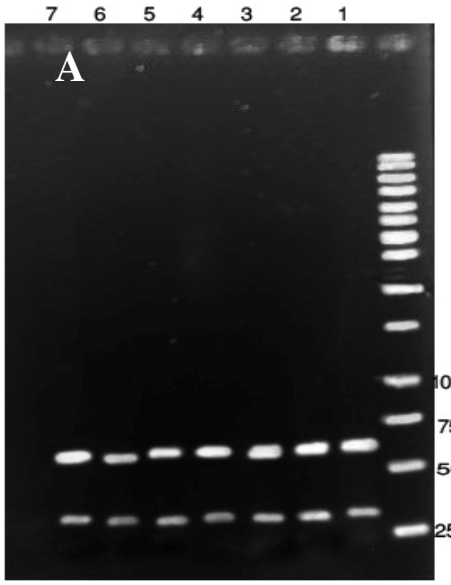
دو آنزیم Hinf I، و Hind III دارای محل تشخیص و برش روی ناحیه تکثیر شده ITS بودند. محصول

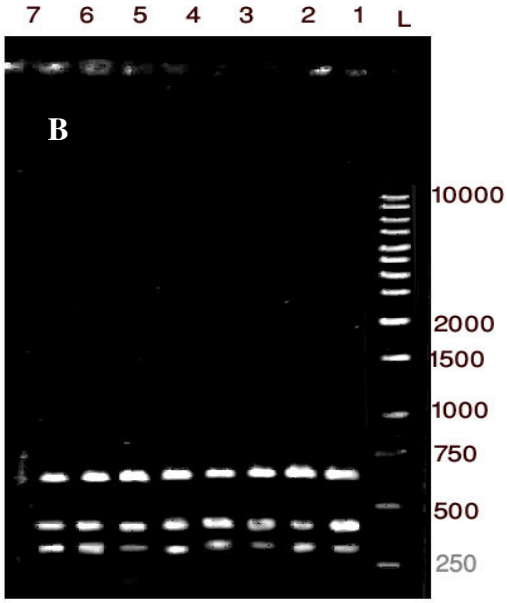


شکل ٢- قطعه DNA تکثیر شده توسط دو جفت آغازگر ITS1, ITS4 و NS1, NS8: قارچ *G. leptostyla*

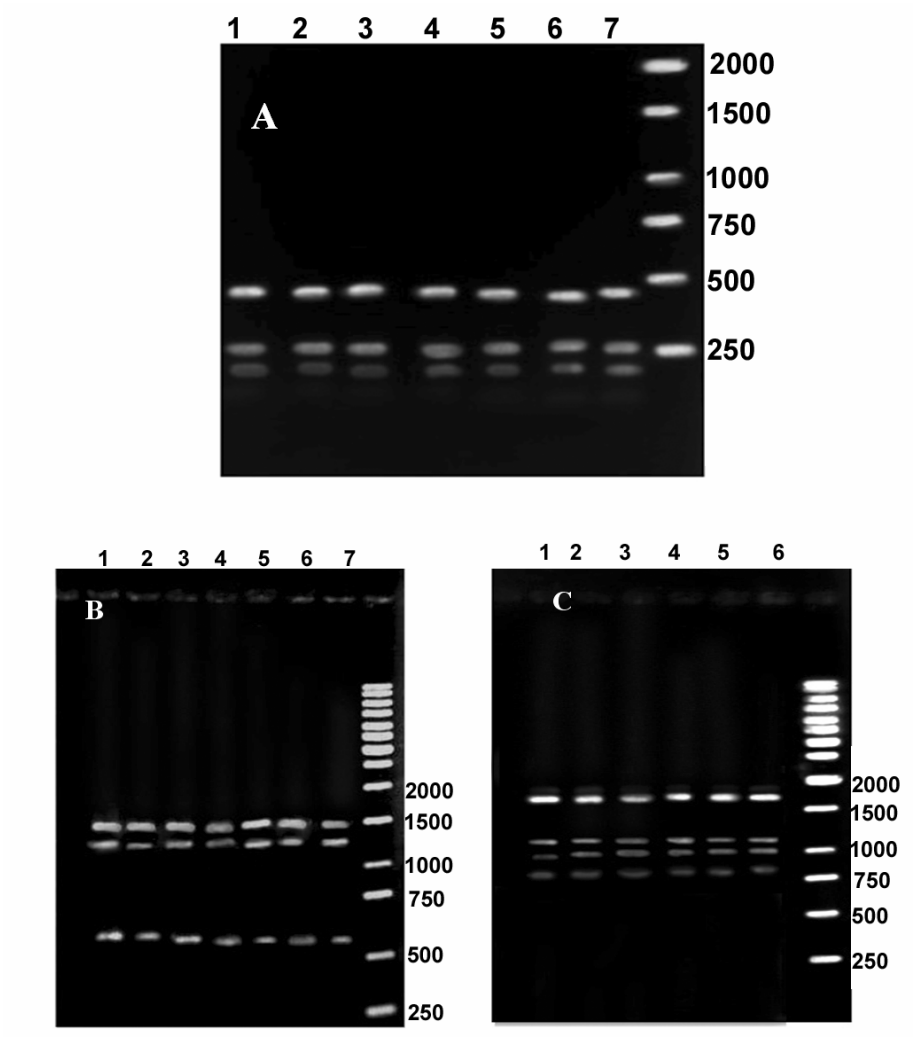
هضم آنزیم Hinf I، دو قطعه با بزرگی ٢٦٥ و ٣٣٥ جفت باز بود. آنزیم Hind III نیز با دو مکان تشخیص و برش روی محصول ITS تمام جدایه ها، سه قطعه به اندازه های٦٣٠، ٤٢٠ و ٣٢٠ جفت باز تولید کرد (شکل ٣). در خصوص ناحیه SSU نیز سه آنزیم Dra I, Bsu II و Sma I دارای محل تشخیص و برش روی این ناحیه شدند (شکل٤). در نتیجه هضم آنزیم Sma I، سه قطعه به طول‌های ٤٥٠،٢٧٠ و ٢٠٠ جفت بازی تولید شد.

در نتیجه برش آنزیم Dra I نیز سه قطعه با طول‌های ١٤٥٠، ١٢٥٠ و ٥٧٠ جفت بازی تولید شد و سرانجام آنزیم Bsu II دارای سه محل تشخیص روی ناحیه SrDNA بود که به واسطه آن چهار قطعه به بزرگی ١٧٣٠، ١١٢٥، ١٠٠٠ و٨٥٠ جفت بازی ایجاد گردیدند. در مجموع نتایجی که از تاثیر آنزیم‌های محدود کننده روی جدایه‌های مختلف به‌دست آمد حاکی از آن بود که طبق این روش، بین جدایه‌های مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی تفاوتی وجود ندارد و همگی در یک گروه جای می گیرند.





شکل٣- باندهای حاصل از هضم محصولات PCR نواحیITS و SurDNA جدایه های مختلف *G. leptostyla* با استفاده از آنزیم های برشگر Hinf I (A و Hind III (B روی ژل آگارز ١/٥٪ رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید



شکل٤- نقوش باندهای DNA حاصل از هضم محصولات PCR نواحی ژنهای ریبوزومی SrDNA جدایه های مختلف *G. leptostyla* با استفاده از آنزیم های برشی Sma I (A ، Dra I (B و Bsu II (C

ناحیه ITS به عنوان یکی از رایج ترین نواحی DNA قارچ ها محسوب می شود که به خاطر تغییر پذیری بالای آن بیشتر از سایر نواحی rDNA (LSU و SSU)، در سیستماتیک مولکولی در سطح گونه و حتی داخل گونه مورد استفاده قرار می‌گیرد.

طبق آزمایش‌های انجام گرفته هیچ تفاوتی در طول نواحی ITS و SrDNA، از میان ٦٠ جدایه قارچی مشاهده نگردید. ضمن اینکه در نتیجه هضم قطعات توسط آنزیم‌های برشی نیز هیچ گونه اختلاف و تنوعی در آرایش و الگوی باندها دیده نشد. به‌طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج به‌دست آمده از کارهای بلیساریو و همکاران (۱۹۹۲) همخوانی دارد. نتایج بدست آمده از تجزیه و تحلیل rDNA نشان دهنده پایداری بالا و نیز یکنواختی سطح ریبوزومی *G. leptostyla* می باشد بنابراین می‌توان فرض نمود که احتمالاً رشد و توسعه نژادهای

گوناگون مانند نژادهای جغرافیایی رخ نداده است. ضمن این که به نظر می رسد جهت دستیابی به نتایج دقیق‌تر استفاده از تکنیک‌های دیگر همچون استفاده از آغازگرهای IGS و نیز روش rep-PCR مناسب‌تر بوده و استفاده از جدایه هایی با دامنه پراکنش جغرافیایی بیشتر و روی میزبان‌های دیگری از جنس *Juglans* نیز در حصول تنوع ژنتیکی در این قارچ مؤثر خواهد بود. تحقیقات بیشتر در این زمینه می تواند در برنامه های اصلاح نژاد و تولید و تکثیر ارقام مقاوم و متحمل گردو در برابر بیماری آنتراکنوز مد نظر قرار گیرد و با وجود تفاوت‌های انفرادی در خصوصیات ریخت شناسی مانند نوع کشت، میزان رشد و باردهی نیاز به بررسی های بیشتری می‌باشد.

منابع

١. بهداد، ا. ١٣٦٩. بیماری های درختان میوه ایران، چاپ دوم. انتشارات نشاط اصفهان، ٢٩٣ ص.

٢. صارمی، ح. و ر. رزاز هاشمی. ١٣٧٩. پراکنش و اپیدمی لکه سیاه گردو در غرب کشور. چهاردهمین کنگره گیاه پزشکی ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحه٣٣٢.

٣. جوان نیکخواه، م. ١٣٨٠. تحقیق روی تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ *Magnaporthe grisea* (Hebert) عامل بیماری بلاست برنج، با استفاده از خصوصیات مولکولی، بیماریزایی و سازگار رویشی در استان گیلان. رساله دکتری در رشته بیماری‌شناسی گیاهی. دانشگاه تهران، کرج، ایران. ١٧٠ ص.

٤. شهریاری، ف. و ع. امام جمعه. ١٣٨١. واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR ، مقدمه‌ای بر تکنیکهای مولکولی (ترجمه). دانشگاه امام رضا (ع). ٢٢٨ ص.

٥. شیخ الاسلامی، م. ١٣٨٤. بررسی برخی خصوصیات بیولوژی و تنوع ژنتیکی *Erysiphe betae* عامل بیماری سفیدک پودری چغندرقند. رساله دکتری بیماری شناسی. گروه گیاهپزشکی. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تهران. ١٣٤ ص.

6. Aanen, D.K., T.W. Kuiper and R.F. Hoekstra. 2001. A widely distributed DNA polymorphism within a biological species of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma velutipes*. Mycol. Res. 105 (3): 284-290.
7. Belisario, A., M. Hubbes. 1992. Genetic Variability in *Gnomonia leptostyla*. ISHS Acta Horticulturae. 385-387.
8. Black, W.M., and D. Neely. 1974. Effect of select environmental. American Phytopathological Society, 3: 284. USA.
9. Bruns, T.D., T.J. White, and J.W. Taylor. 1992. Evolutionary relationship within the fungi: analyses of small subunit rRNA sequences. Mol. Phylogen. Evol. 1: 231-243.
10. Buchko, J., and G.R. Klassen. 1990. Detection of length heterogeneity in the ribosomal DNA of *Pythium ultimum* by PCR amplification of the intergenic region. Curr. Genet. 18: 203-205.
11. Gardes, M. and T.D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2: 113-118.
12. Gargas, A., P.T. Depriest. 1996. A nomenclature for fungal PCR primers with example from intron-containing SSU rDNA. Mycologia 88: 745-748.

13. Harrington, T.C., J. Steimel, F. Workneh and X.B. Yang. 2000. Molecular identification of fungi associated with vascular discoloration of soybean in the north central United States. Plant dis. 84: 83-89.
14. Liu, D., S. Coloe, R. Baird, and J. Pedersen. 2000. Rapid Mini-preparation of Fungal DNA for PCR. Journal of Clinical Microbiology 38: 471.
15. White, T.J., T. Bruns, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols, A guide to methods and amplification. Academic press San Diego, 315-322.
16. Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and W. Meyer. 1995. DNA fingerprinting in plant and fungi. CRC Press. PP. 322.