

گروه‌های سازگار میسلیمی و تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* عامل پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه کلزا در استان

مازندران

Mycelial Compatibility Groups and Genetic Diversity in Populations of *Sclerotinia sclerotiorum*, the Causal Agent of Sclerotinia Stem Rot of Rapeseed in Mazandaran Province

سارا محسنی چمازکتی^۱، سعید رضایی^{۲*}، سید علیرضا دلیلی^۳ و مجید الداغی^۳

دریافت: ۱۴۰۳/۸/۱

پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۲

چکیده

بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه، ناشی از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های کلزا در ایران می‌باشد. به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *S. sclerotiorum* نمونه‌برداری از مزارع کلزا در مناطق مختلف استان مازندران انجام گرفت. تعداد ۵۶ جدایه، براساس پراکنش جغرافیایی انتخاب گردید، سپس، جهت بررسی ساختار ژنتیکی جدایه‌ها، از گروه‌های سازگاری میسلیمی (MCGs) و نشانگرهای ریزماهواره (SSRs) استفاده شد. در مجموع، ۳۲ گروه سازگاری میسلیمی شناسایی شد که ۵۹/۴ درصد از آنها فقط شامل یک جدایه بودند، درحالی‌که سایر گروه‌ها، ۷-۲ جدایه داشتند. آزمون مولکولی با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره انجام گردید. در نهایت، ۳۱ هاپلوتیپ ریزماهواره در همه جمعیت‌ها شناسایی و چند هاپلوتیپ با فراوانی بالا یافت شدند. تنوع ژنی در هفت جمعیت در محدوده ۰/۴۱۲۰ تا ۰/۵۱۱۱ متغیر بود. بیشترین و کمترین تنوع ژنتیکی درون جمعیت به ترتیب مربوط به جمعیت شهرستان‌های بهشهر و ساری بود. بین هاپلوتیپ‌های ریزماهواره و گروه‌های سازگاری میسلیمی ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ($P=0/36$, $V=0/75$). نتایج حاصل از این مطالعه برای اصلاح ارقام مقاوم و توسعه راهبردهای مدیریت بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه مفید خواهد بود.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، سازگاری میسلیمی، نشانگرهای ریزماهواره، کلزا، پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه

مقدمه

بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه، ناشی از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary می‌باشد که یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین عوامل بیماری‌زای گیاهی با دامنه میزبانی و پراکنش جغرافیایی گسترده است. این بیمارگر توانایی آلوده‌سازی بیش از ۴۰۰ گونه گیاهی، از جمله محصولات زراعی مهمی نظیر سویا، آفتابگردان، کلزا، کاهو، هویج، سیب‌زمینی، لوبیا و نخود را دارد (Bolton et al., 2006). در کلزا، این بیماری از عوامل اصلی کاهش عملکرد محسوب می‌شود و در شرایط آب و هوایی مساعد، به‌ویژه در جلگه‌های شمالی دریای خزر، به‌سرعت گسترش می‌یابد (Pakdaman and Goltapeh., 2007). بسته به شدت آلودگی و شرایط محیطی، خسارت بیماری متغیر بوده

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، آب، غذا و فراوسدمندها، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، ساری، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: srezaee@srbiau.ac.ir

و در موارد طغیانی و شیوع شدید بیماری می‌تواند تا ۱۰۰ درصد کاهش عملکرد محصول را به همراه داشته باشد (Saharan and Mehta, 2008).

مدیریت *S. sclerotiorum* به دلیل دامنه میزبانی وسیع، توانایی بقای طولانی مدت سختینه‌ها در خاک و تنوع ژنتیکی بالا با چالش‌های جدی مواجه است. این بیمارگر از دو مسیر متفاوت برای آلودگی استفاده می‌کند: (۱) آلودگی بخش پایینی ساقه از طریق میسلیم‌های خاکزاد حاصل از جوانه‌زنی میسلیوژنیک سختینه‌ها و (۲) آلودگی اندام‌های هوایی گیاه از طریق آسکوسپورهایی که در نتیجه جوانه‌زنی کارپوژنیک تولید می‌شوند (Ajiboye et al., 2025). راهبردهای کنترل بیماری شامل مجموعه‌ای از اقدامات زراعی، شیمیایی و استفاده از ارقام مقاوم است. روش‌های زراعی عمدتاً پیشگیرانه بوده و به دلیل بقای چند ساله سختینه‌ها و دامنه وسیع میزبانی قارچ، اثربخشی محدودی دارند. قارچ‌کش‌ها نیز اگرچه کاربرد گسترده‌ای دارند، اما به علت هزینه بالا و وابستگی شدید کارایی به زمان‌بندی مناسب، نتایج متغیری ارائه می‌کنند. از این‌رو، ترکیب مقاومت ژنتیکی با مدیریت زراعی و کنترل شیمیایی بهینه، به عنوان رویکردی کلیدی برای مهار بیماری توصیه می‌شود (Khan et al., 2023). موفقیت این رویکردها، به‌ویژه توسعه ارقام مقاوم، وابسته به شناخت دقیق تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت *S. sclerotiorum* است (McDonald and Linde, 2002).

تنوع ژنتیکی در پاتوزن‌های قارچی عمدتاً ناشی از جهش‌ها و نوترکیبی است (Liu et al., 2018). شناسایی گروه‌های سازگاری میسلیمی (MCGs) یکی از روش‌های رایج برای توصیف دودمان‌های همسانه‌ای و ارزیابی تنوع ژنتیکی قارچ‌ها از جمله *S. sclerotiorum*، به‌شمار می‌آید (Carbone et al., 1999). با این حال، MCGها شاخصی غیرمستقیم از تنوع ژنتیکی ارائه داده و قادر به تعیین دقیق روابط فیلوژنتیکی درون یا بین گروه‌ها نیستند (Litholdo Júnior et al., 2011). طی سال‌های اخیر، MCGهای متعددی در جمعیت‌های *S. sclerotiorum* جدا شده از میزبان‌ها و مناطق جغرافیایی مختلف شناسایی و گزارش شده است (Aldrich-Wolfe et al., 2015; Barari et al., 2014; Barari et al., 2011; Iran et al., 2011; Karimi et al., 2012; Litholdo Júnior et al., 2011; Liu et al., 2018; Tok et al., 2016; Silva et al., 2021; Yu et al., 2020).

برای بررسی دقیق‌تر ساختار ژنتیکی و روابط بین جدایه‌ها، از روش‌های مولکولی متنوعی مانند RAPD (Litholdo Júnior et al., 2011; Tok et al., 2016)، ISSR (Faraghati et al., 2022; Xu et al., 2014) و SSR (Aldrich-Wolfe et al., 2015; Barari et al., 2017; Clarkson et al., 2013; Hemmati et al., 2009; Liu et al., 2018; Tok et al., 2016; Silva et al., 2021; Yu et al., 2020) استفاده شده است. در میان این روش‌ها، نشانگرهای ریزماهوره (SSRs) به دلیل چندشکلی بالا، اختصاصی بودن در جایگاه ژنی، چندآلی بودن و قابلیت تکثیر آسان توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، ابزار ارزشمندی در مطالعات ژنتیک جمعیت، تکامل و برنامه‌های به‌نژادی محسوب می‌شوند (Liu et al., 2018).

بررسی‌های پیشین نشان می‌دهند که *S. sclerotiorum* دارای تنوع ژنتیکی قابل توجهی است و هر دو نوع تولیدمثل جنسی و غیرجنسی در آن رخ می‌دهد (Litholdo Júnior et al., 2011). کلونالیتی در *S. sclerotiorum* ناشی از تولیدمثل جنسی از طریق خودباروری است که منجر به تولید میلیون‌ها آسکوسپور می‌شود و همچنین از طریق تولید مثل غیرجنسی با تشکیل سختینه‌ها رخ می‌دهد (Kohn, 1995). با این حال، شواهدی از وقوع دگرلقاحی نیز در برخی مناطق، از جمله ایران، گزارش شده است (Hemmati et al., 2009).

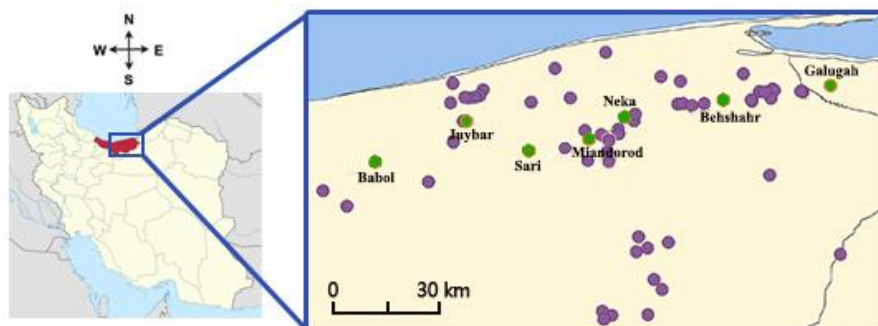
در ایران، مطالعات مختلف با استفاده از SSR و MCG نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا، تعداد متنوعی از گروه‌های سازگاری میسلیمی و ساختار جمعیتی ناهمگن در جمعیت‌های *S. sclerotiorum* بوده‌اند (Barari et al., 2012, 2014, 2017; Hemmati et al., 2009; Faraghati et al., 2022; Karimi et al., 2012). این شواهد اهمیت پایش مستمر تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی این بیمارگر را در طراحی برنامه‌های مدیریتی مؤثر نشان می‌دهد.

در استان مازندران، قارچ *S. sclerotiorum* یکی از عوامل اصلی پوسیدگی ساقه کلزا به شمار می‌رود و طی دهه‌های اخیر موجب کاهش قابل توجه عملکرد محصول شده است. بر این اساس، هدف مطالعه حاضر، بررسی ساختار ژنتیکی جدایه‌های *S. sclerotiorum*، عامل پوسیدگی ساقه کلزا، با استفاده از آزمون گروه‌های سازگاری میسلیمی (MCG) و روش تعیین ژنوتیپ (genotyping) مبتنی بر نشانگرهای SSR، در این استان بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، کشت و جداسازی نمونه‌ها

نمونه‌برداری از مزارع کلزا در استان مازندران، از شهرستان‌های گلوگاه، بهشهر، نکا، میاندرد، ساری، جویبار و بابل انجام گرفت (شکل ۱). بدین ترتیب، نمونه‌ها از گیاهان دارای علائم بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه در فصل زراعی سال ۱۴۰۰ جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها پس از خشک شدن در هوای آزاد، در پاکت‌های کاغذی جداگانه قرار گرفته و به آزمایشگاه مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل شدند. سختینه‌های قارچ پس از جداسازی از ساقه و طوقه، ابتدا به مدت ۱۰ ثانیه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ و سپس به مدت ۲-۳ دقیقه در اتانول ۷۰٪ ضدعفونی سطحی شدند. پس از آن، سختینه‌ها با آب مقطر سترون شستشو داده شده و روی کاغذ خشک‌کن سترون خشک شدند؛ سپس به تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA منتقل گردیدند. تشتک‌ها در تاریکی و در دمای اتاق (۲۲-۲۴°C) نگهداری شدند. پرگنه قارچ پس از ۳-۵ روز ظاهر شد. جدایه‌ها پس از خالص‌سازی به روش نوک هیف، به تشتک‌های جدید حاوی PDA منتقل شده و در یخچال تحت دمای ۴°C نگهداری شدند.



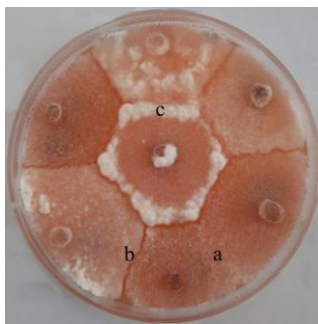
شکل ۱- نقشه پراکنش جغرافیایی جدایه‌های *Sclerotinia sclerotiorum* از مزارع کلزا در استان مازندران. این نقشه با استفاده از نرم‌افزار QGIS Desktop (نسخه ۳.۴۰.۸) تهیه شده است.

Fig. 1. Geographic distribution map of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from rapeseed fields in Mazandaran Province. The map was generated using QGIS Desktop (version 3.40.8)

تعیین گروه‌های سازگار میسلیمی (MCGs)

جهت تعیین سازگاری یا ناسازگاری بین جدایه‌های مختلف قارچ، آزمون سازگاری میسلیمی بر اساس روش شافر و کوهن (Schafer and Kohn, 2006) انجام شد. جدایه‌ها ابتدا روی محیط کشت PDA کشت داده شدند. سپس، قرص‌های میسلیمی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت‌های در حال رشد سه تا چهار روزه برداشته و در تشتک‌های ۹ سانتی‌متری حاوی محیط PDA، که به آن ۷۵ میکرولیتر بر لیتر رنگ خوراکی قرمز مک‌کورمیک (McCormick's red food coloring) به‌منظور افزایش وضوح خطوط واکنش ناسازگار افزوده شده بود، قرار داده شدند. قرص‌های میسلیمی با فاصله تقریبی ۳/۵ سانتی‌متر از یکدیگر جفت شدند. تشتک‌ها در دمای ۲۲-۲۴°C و تاریکی نگهداری و پس از گذشت چهار تا هفت روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. هر جدایه با تمام جدایه‌های دیگر به‌صورت دوتایی و در تمامی ترکیبات ممکن جفت

شد و هر ترکیب در سه تکرار انجام گردید. جدایه‌ها در صورتی سازگار در نظر گرفته شدند که ریشه‌های دو جدایه در محل تماس بدون تشکیل مرز مشخص با هم ادغام شده و یک کلنی واحد را تشکیل دهند. در مقابل، ناسازگاری با تشکیل خط به‌عنوان واکنشی در ناحیه تماس و حد فاصل دو جدایه تعیین گردید، خط مذکور شامل میسلیم هوایی یا یک نوار قرمز عاری از میسلیم بود (شکل ۲).



شکل ۲- واکنش‌های سازگار و ناسازگار بین جدایه‌های مختلف *S. sclerotiorum* روی محیط کشت PDA بعد از چهار روز: (a) سازگاری، با ادغام سه کلنی نشان داده شده است؛ (b-c) ناسازگاری، که به‌صورت ناحیه واکنش نشان داده شده است: (b) یک ناحیه عاری از میسلیم همراه با یک خط قرمز مشخص؛ (c) نواری از میسلیم‌های هوایی یکنواخت.

Fig. 2. Compatible and incompatible reactions among different isolates of *S. sclerotiorum* tested on PDA medium after four days: (a) Compatibility, indicated by fusion of the three colonies; (b-c) Incompatibility, shown as a barrage zone: (b) a region of no mycelia accompanied by a distinct red line; (c) a band of uniform aerial mycelia.

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

برای تهیه توده میسلیم مورد نیاز جهت استخراج DNA از حاشیه پرگنه در حال رشد هر جدایه، یک قرص میسلیمی پنج میلی‌متری به ارلن حاوی محیط کشت مایع سترون شده عصاره سیب زمینی- دکستروز (PDB) انتقال داده شدند. پس از رشد کافی، توده میسلیمی هر یک از جدایه‌ها با آب مقطر سترون آبکشی شد تا محیط کشت به‌طور کامل از روی آن شسته شود. سپس توده میسلیم روی کاغذ صافی سترون خشک گردید. برای استخراج DNA، حدود یک گرم از میسلیم خشک شده با استفاده از ازت مایع و هاون سرد پودر و به ویال سترون منتقل گردید و تا زمان استفاده در دمای -20°C نگهداری شد. استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام شد (Sambrook and Russel, 2001).

برای بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *S. sclerotiorum* از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره طراحی شده توسط سیرجوسینگ و کوهن (Sirjusingh and Kohn, 2001)، که در مطالعات پیشین چند شکلی بالایی نشان دادند، استفاده شد (Hemmati et al., 2009؛ Barari et al., 2012, 2017). برای نشان دادن تنوع در تمامی جدایه‌ها، تکثیر DNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و آغازگرها (جدول ۱) به‌طور جداگانه انجام شد. مخلوط واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix (Amplicon, Denmark)، یک میکرولیتر از هر آغازگر (یک میکرولیتر آغازگر مستقیم و یک میکرولیتر آغازگر معکوس) (غلظت نهایی ۰/۵ میکرومولار برای هر آغازگر)، ۱/۵ میکرولیتر DNA ژنومی (با غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و آب مقطر دیونیزه به‌منظور تکمیل حجم واکنش بود. پس از قرار دادن میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Mastercycler)، دمای اتصال آغازگرها در واکنش PCR به شرح جدول ۱ تنظیم گردید.

چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشت سازی اولیه در 95°C به مدت چهار دقیقه، سپس ۳۲ چرخه شامل واسرشت‌سازی در 94°C به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال و هیبرید شدن آغازگرها در دمای $63-55^{\circ}\text{C}$ بسته به نوع آغازگر به مدت ۴۰ ثانیه، گسترش در 72°C به مدت یک دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در 72°C به مدت پنج دقیقه بود. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز سه درصد در بافر 1x TAE، در ولتاژ ۱۴۵ ولت به مدت دو تا سه ساعت انجام شد. وزن مولکولی باندها با استفاده از DNA ladder (100 bp DNA Ladder, CinaGen) در محدوده ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز به عنوان مرجع اندازه در طی الکتروفورز تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تنوع هاپلوتیپ و فراوانی مرتبط با آن با استفاده از نرم‌افزار PowerMarker 3.25 (Liu and Muse, 2005)؛ North Carolina State University, Bioinformatics Research Center, Raleigh, NC, USA) به دست آمد. شاخص‌های تنوع ژنتیکی شامل تعداد آلل‌های مشاهده شده (N_a)، تعداد آلل‌های مؤثر (N_e)، تنوع ژنی نئی (h)، شاخص تنوع شانون (I)، و فاصله ژنتیکی با بهره‌گیری از نرم‌افزار GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012)؛ Australian National University, Research School of Biology, Canberra, Australia) محاسبه شدند. دندروگرام روابط فیلوژنتیکی نیز با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc 2.2 (Rohlf, 2009; Exeter Software, Setauket, NY, USA) ترسیم گردید.

جدول ۱- آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده برای تعیین ویژگی جدایه‌های *S. sclerotiorum* از کلزا در استان مازندران

Table 1. Microsatellite primers used to characterize isolates of *S. sclerotiorum* from rapeseed in Mazandaran province

جایگاه ژنی Locus ^a	توالی آغازگر Primer sequence (5-3)	توالی موتیف Repeat motif	دمای اتصال Tm ($^{\circ}\text{C}$) ^b
5-2	GTAACACCGAAATGACGGC GATCACATGTTTATCCCTGGC	(GT)8	63
7-2	TTTGCGTATTATGGTGGGC ATGGCGCAACTCTCAATAGG	(GA)14	63
8-3	CACTCGCTTCTCCATCTCC GCTTGATTAGTTGGTTGGCA	CA12	60
9-2	GCCGATATGGACAATGTACACC TCTTCGCAGCTCGACAAGG	(CA)9(CT)9	63
12-2	CGATAATTTCCCTCACTTGC GGAAGTCCTGATATCGTTGAGG	(CA)9	55
55-4	GTTTTCGGTTGTGTGCTGG GCTCGTTCAAGCTCAGCAAG	TACA10	60
92-4	TCGCCTCAGAAGAATGTGC AGCGGGTTACAAGGAGATGG	(CT)12	55
106-4	TGCATCTCGATGCTTGAATC CCTGCAGGGAGAAACATCAC	(CATA)25	55
110-4	ATCCCTAACATCCCTAACGC GGAGAATTGAAGAATTGAATGC	(TATG)9	60
114-4	GCTCCTGTATACCATGTCTTG GGACTTTCGGACATGATGAT	(AGAT)14(AAGC)4	60

^a اقتباس از سیرجوسینگ و کوهن (Sirjusingh and Kohn, 2001)

^b Optimized annealing temperature

نتایج

در این مطالعه، تعداد ۵۶ جدایه از قارچ *S. sclerotiorum* جداسازی و مورد مطالعه قرار گرفتند. این جدایه‌ها از هفت شهرستان استان مازندران، از جمله گلوگاه (۶ جدایه)، بهشهر (۹ جدایه)، نکا (۱۱ جدایه)، میاندورود (۶ جدایه)، ساری (۱۰ جدایه)، جویبار (۸ جدایه)، و بابل (۶ جدایه) جمع‌آوری شدند (جدول ۲ و شکل ۱).

جدول ۲- منطقه نمونه‌برداری، گروه‌های سازگار میسلیمی (MCGs) و هاپلوتیپ SSR در ۵۶ جدایه *S. sclerotiorum*
 Table 2. Sampling region, mycelial compatibility groups (MCGs), and SSR haplotype of 56 *S. sclerotiorum* isolates.

Isolate	منطقه نمونه برداری (شهرستان) Sampling region (County)	گروه سازگاری میسلیمی MCG	هاپلوتیپ Haplotype	Isolate	منطقه نمونه برداری (شهرستان) Sampling region (County)	گروه سازگاری میسلیمی MCG	هاپلوتیپ Haplotype
GS1	Sangyabsar (G) سنگی ایسر	1	10	MD2	Darabkola (M) دارابکلا	19	17
GG1	Ghalepayan (G) قلعه پایان	14	4	MA2	Asram (M) اسرام	11	2
GG3	Ghalepayan (G) قلعه پایان	9	11	MJ1	Jafkhaneh (M) جف خانه	11	1
GL2	Lamrask (G) لمراسک	1	1	MT2	Dashtenaz (M) دشت ناز	3	18
GH1	Hasanabad (G) حسن آباد	13	12	ST1	Shivilasht-Erout (S) شویلاشت-اروت	25	1
GM2	Mehdiraje (G) مهدیراجه	1	1	SL2	Shivilasht-Khalekheyl (S) شویلاشت-خاله خیل	2	1
BH1	Hosseiniabad (BE) حسین آباد	28	4	SN1	Shivilasht-Nokandeh1 (S) شویلاشت-نوکنده	2	19
BT1	Gharetape (BE) غارتپه	1	1	SE	Panbehzarkoti-Esfandan (S) پنبه زر کوتی	15	20
BG2	Gorjimahale (BE) گرجی محله	1	13	SJ1	Farim- Jafarkola (S) فریم-جعفرکلا	18	1
BV1	Rakavand (BE) رکاوند	31	4	SB1	Semeskandeh- Esbukola (S) سمسکنده-اسبوکلا	10	1
BV2	Rakavand (BE) رکاوند	32	14	SB2	Semeskandeh- Esbukola (S) سمسکنده-اسبوکلا	2	21
BP2	Pasand (BE) پسند	6	15	SR1	Shivilasht- Karsam (S) شویلاشت-کرسام	9	22
BZ1	Tazehabad (BE) تازه آباد	21	9	SR2	Shivilasht- Karsam (S) شویلاشت-کرسام	16	3
BL1	klack (BE) کلاک	22	9	SU1	North Farahabad- Souteh (S) فرح آباد سوته-شمال	16	23
BE1	Emamdeh (BE) امامده	1	1	JD	Duncha (J) دونچا	24	24
NU1	Umal (N) اومال	7	4	JM2	Mianmelk (J) میان ملک	8	3
NA2	Ablou (N) آبلو	29	2	JM3	Mianmelk (J) میان ملک	4	25
NA3	Ablou (N) آبلو	2	2	JR	Rangrizmahaleh (J) رنگریز محله	26	26
NP1	Chalehpol (N) چاله پل	4	8	JL	Aliabad (J) علی آباد	27	3
NP2	Chalehpol (N) چاله پل	7	7	JK1	Kordkola (J) کردکلا	4	27
NP3	Chalehpol (N) چاله پل	7	7	JK2	Kordkola (J) کردکلا	8	3
NB	Berijan (N) بریجان	23	4	JO1	Golmahaleh (J) گل محله	6	2
NN1	Nozarabad (N) نوذرآباد	1	16	BM1	Moalemkola (BA) معلم کلا	5	28
NZ1	Ziartkola (N) زیارتکلا	12	6	BM3	Moalemkola (BA) معلم کلا	20	1
NZ2	Ziartkola (N) زیارتکلا	12	2	BA2	Lalehabad (BA) لاله آباد	5	29
NS2	Samandareh (N) سامان دره	4	8	BA3	Lalehabad (BA) لاله آباد	5	30
MS	Sourbon (M) سوربان	17	2	BF1	Afrakoti (BA) افراکوتی	30	31
MU1	Ussa (M) اوسا	3	6	BF3	Afrakoti (BA) افراکوتی	5	4

^a G, Galugah; BE, Behshahr; N, Neka; M, Miandorod; S, Sari; J, Juybar; BA, Babol

سازگاری میسلیمی

مطالعات مربوط به تعیین گروه‌های سازگار میسلیمی برای گروه‌بندی جدایه‌های *S. sclerotiorum* بر اساس سازگاری میسلیمی آنها انجام شد. از بین ۵۶ جدایه بررسی شده، ۳۲ گروه سازگار میسلیمی شناسایی شد که ۶۲/۵ درصد آنها تنها شامل یک جدایه بودند و در بقیه گروه‌ها، بیش از یک جدایه در هر گروه وجود داشت (جدول ۲). گروه سازگاری میسلیمی MCG 1 با هفت جدایه، بیشترین تعداد جدایه‌ها را به خود اختصاص داد. این جدایه‌ها از شهرستان‌های گلوگاه، بهشهر و نکا جمع‌آوری شده بودند. سایر MCGها شامل ۲ تا ۴ جدایه بودند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که جدایه‌های یک منطقه نمونه‌برداری اغلب به MCGهای متفاوتی تعلق داشتند. به‌عنوان مثال، دو جدایه SR1 و SR2 از مزارع کرسام در ساری به ترتیب در MCG 9 و MCG 16 قرار گرفتند، در حالی که دو جدایه JK1 و JK2 از مزارع کردکلا در جویبار به MCG 4 و MCG 8 اختصاص یافتند. با این حال، در برخی موارد، جدایه‌های یک منطقه در یک MCG مشترک قرار گرفتند. به‌عنوان نمونه دو جدایه NZ1 و NZ2 که از مزارع زیارت کلا در نکا جمع‌آوری شدند، هر دو به MCG 12 تعلق داشتند (جدول ۲).

تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگرهای ریزماهواره

تنوع ژنتیکی ۵۶ جدایه *S. sclerotiorum* با استفاده از ۱۰ جفت پرایمر ریزماهواره که تنوع آلی مناسبی را نشان داده‌اند، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تکثیر ۱۰ جفت پرایمر در جدول ۳ ارائه شده است. در مجموع ۴۶ آلل شناسایی شد که تعداد آلل‌ها در هر لوکوس بین ۲ تا ۱۴ عدد متغیر بود. میانگین تعداد آلل در کل جایگاه‌ها برابر با ۴/۶ بود. اندازه آلل‌ها بین ۱۶۸ تا ۶۰۰ جفت باز متغیر بود، به‌طوری‌که کوچک‌ترین باند مربوط به نشانگر ۲-۷ و بزرگ‌ترین باند مربوط به نشانگر ۴-۱۰۶ شناسایی شد. دامنه تنوع ژنی نئی بین ۰/۲۸۱۲ تا ۰/۸۸۲۰ متغیر بود (جدول ۳). بر اساس داده‌های ریزماهواره‌ای، در مجموع ۳۱ هاپلوتیپ در میان ۵۶ جدایه از هفت جمعیت *S. sclerotiorum* شناسایی شد (جدول ۲ و ۴). تعداد هاپلوتیپ‌ها در هر جمعیت بین ۵ تا ۷ متغیر بود (جدول ۴) و ۹ هاپلوتیپ بین دو یا چند جدایه مشترک بودند (شکل ۳).

جدول ۳- تنوع ژنتیکی در ۱۰ جایگاه ریزماهواره مورد استفاده برای تحلیل *S. sclerotiorum* جمع‌آوری شده از استان مازندران

Table 3. Genetic variation at 10 microsatellite loci used to analysis *S. sclerotiorum* collected from Mazandaran province

تایگاه ژنی	آلل‌های مشاهده شده	محدوده اندازه	تنوع ژنی
Locus	Alleles observed	Size range (bp)	Gene diversity
5-2	2	318-320	0.4591
7-2	2	168-172	0.3367
8-3	4	240-255	0.5503
9-2	3	356-370	0.2812
12-2	3	212-220	0.4649
55-4	5	178-220	0.6109
92-4	3	369-377	0.4789
106-4	14	498-600	0.8820
110-4	4	340-357	0.6926
114-4	6	350-388	0.6664

^a تنوع ژنی محاسبه شده توسط روش نئی (نئی ۱۹۷۳)

^a Gene diversity calculated via Nei's method (Nei 1973)

متداول‌ترین هاپلوتیپ در ۱۰ جدایه (BM3, ST1, SJ1, SB1, SL2, MJ1, BT1, BE1, GM2, GL2) مشاهده شد، که این جدایه‌ها از پنج شهرستان گلوگاه، بهشهر، میاندرد، ساری و بابل جمع‌آوری شده‌اند. دومین هاپلوتیپ رایج، که در سه

لوکوس با هاپلوتیپ نخست تفاوت داشت، در مجموع در ۶ جدایه (JO1, MS, MA2, NA2, NZ2, NA3) شناسایی شد. این جدایه‌ها از شهرستان‌های نکا، میاندرد و جویبار جمع‌آوری شده‌اند. تعداد ۲۲ هاپلوتیپ باقی‌مانده (۷۰/۹۷٪) با فراوانی کم، تنها در یک جدایه مشاهده شدند. هاپلوتیپ‌های مشترک میان جمعیت‌ها نشان‌دهنده تبادل هاپلوتیپ‌ها بین جمعیت‌ها و یا نشان‌دهنده جمعیت‌هایی با منشأ یکسان هستند (Hemmati *et al.*, 2009).

جدول ۴- تخمین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *S. sclerotiorum* بر اساس نشانگر SSR

Table 4. Estimation of genetic variability in *S. sclerotiorum* populations based on SSR marker

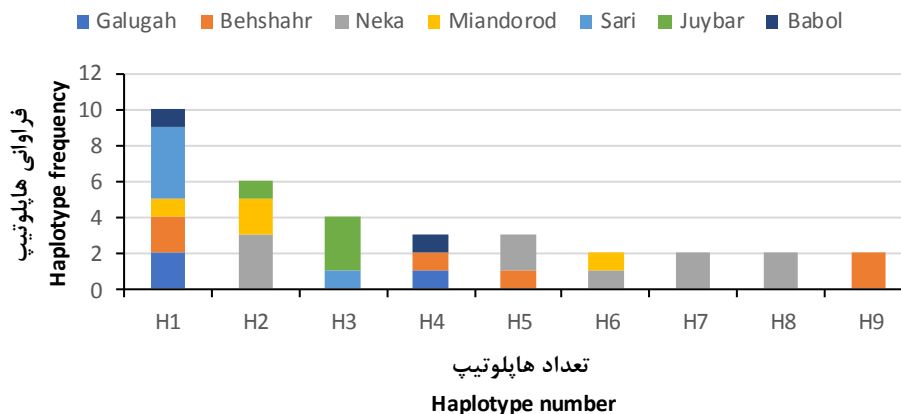
جمعیت	Population	n^a	H^b	$H(\text{unique})$	Na^c	Ne^d	H^e	I^f
گلگاه	Galugah	6	5	2	2.60	2.2325	0.4888	0.8030
بهشت	Behshahr	9	7	4	2.90	2.4545	0.5111	0.8751
نکا	Neka	11	6	3	2.80	2.3174	0.4909	0.8256
میان‌درد	Miandorod	6	5	2	2.60	2.1454	0.4666	0.7780
ساری	Sari	10	7	5	2.70	1.8291	0.4120	0.7034
جویبار	Juybar	8	6	4	2.60	2.1951	0.5062	0.8123
بابل	Babol	6	6	4	2.60	2.1012	0.4444	0.7493

^a اندازه جمعیت، ^b هاپلوتیپ، ^c تعداد آلل‌های مشاهده شده، ^d تعداد آلل‌های موثر، ^e تنوع ژنی، ^f شاخص اطلاعات شانون

^a Population size, ^b Haplotype, ^c Observed number of alleles, ^d Effective number of alleles,

^e Nei gene diversity, ^f Shannon information index

دندروگرام (UPGMA) بر اساس فاصله ژنتیکی *Nei* رسم شد و نشان داد که هفت جمعیت مازندران به‌طور کلی در دو گروه مجزا قرار گرفتند. یک گروه از آنها شش عضوی و گروه دیگر تک عضوی بود. گروه اول شامل جمعیت‌های بهشهر، گلگاه، نکا، ساری، میاندرد و جویبار بود و در گروه دوم جمعیت بابل قرار گرفت (شکل ۴).



شکل ۳- فراوانی هاپلوتیپ‌های ریزماهواره برای جمعیت‌های *S. sclerotiorum* از کلزا در مازندران برای ۹ هاپلوتیپ شامل بیش از یک جدایه

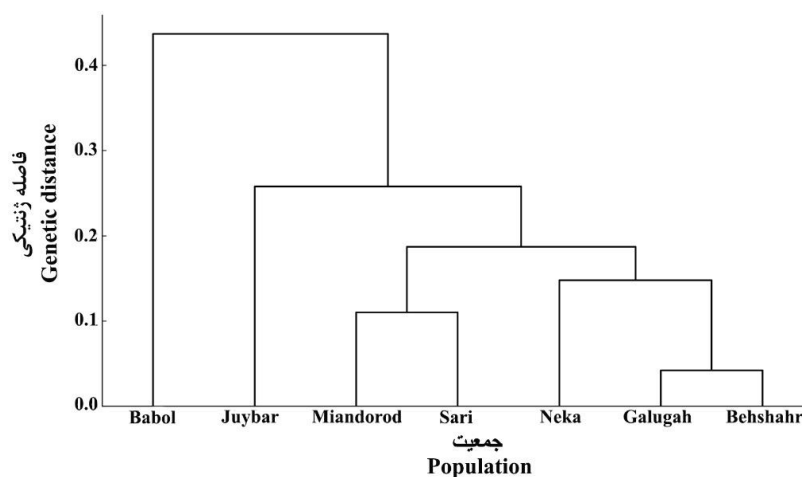
Fig. 3. Microsatellite haplotype frequency for seven *S. sclerotiorum* populations from rapeseed in Mazandaran for 9 haplotypes comprising more than one isolate

بحث

در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ۵۶ جدایه قارچ *S. sclerotiorum* بر اساس گروه‌های سازگاری میسلیمی (MCGs) و نشانگرهای ریز ماهواره (SSR) مورد بررسی قرار گرفت. گروه‌های سازگاری میسلیمی نشان‌دهنده توانایی ادغام یا عدم

ادغام میسلیموم بین جدایه‌ها هستند، در حالی که نشانگرهای ریزماهوره به عنوان ابزاری حساس برای تحلیل ساختار ژنتیکی و ارزیابی تنوع جمعیتی شناخته می‌شوند.

نتایج این تحقیق نشان داد که ساختار جمعیتی *S. sclerotiorum* در مزارع کلزای استان مازندران، شامل ترکیبی ناهمگن از گروه‌های سازگاری میسلیمومی است. شناسایی ۳۲ گروه سازگاری از میان ۵۶ جدایه مورد بررسی، بیانگر تنوع ژنتیکی بالای این قارچ در مناطق مطالعه شده می‌باشد. چنین تنوعی می‌تواند حاصل نرخ بالای مهاجرت، تبادل ژنتیکی یا نوترکیبی در جمعیت‌های قارچی باشد (Kohli et al., 1995). از میان ۳۲ گروه شناسایی شده، ۲۰ گروه تنها شامل یک جدایه بودند. این امر می‌تواند ناشی از جهش‌های تصادفی یا ورود اخیر این گروه‌ها به منطقه باشد. مطالعات مشابه نیز در مناطق مختلف جهان از جمله شمال شرق چین (Liu et al., 2018)، ایالات متحده آمریکا (Aldrich-Wolf et al., 2015)، و ایران (Barari et al., 2012, 2014; Irani et al., 2011) گزارش شده‌اند که همگی بر وجود تنوع بالا در MCG‌های این قارچ در میزبان‌هایی مانند آفتابگردان، کلزا، سویا، لوبیا، هویج و کلم تأکید دارند.



شکل ۴- دندروگرام (UPGMA)، نشان‌دهنده روابط ژنتیکی میان هفت جمعیت *S. sclerotiorum* بر اساس فاصله ژنتیکی نئی

Fig. 4. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) dendrogram showing the genetic relationships among the seven populations of *S. sclerotiorum* based on Nei's genetic distance

در همین راستا، کریمی و همکاران (Karimi et al., 2012) تعداد ۳۵ گروه سازگاری میسلیمومی مجزا را از میان ۵۷ جدایه جمع‌آوری شده از مزارع کلزا در استان گلستان شناسایی کردند که مؤید تنوع بالای جمعیت‌های این قارچ در ایران است. مطالعات مشابه از سایر مناطق جغرافیایی نیز یافته‌های مشابهی را گزارش کرده‌اند. به عنوان مثال، یو و همکاران (Yu et al., 2020) در بررسی ۹۰ جدایه از مزارع کلزای شهر چونگ‌چینگ در چین، ۴۷ گروه سازگاری میسلیمومی شناسایی کردند که ۷۲ درصد از آنها شامل تنها یک جدایه بودند. همچنین، توتووا و همکاران (Tóthová et al., 2021) نیز در مطالعه‌ای روی ۴۰ جدایه از مزارع کلزا در اسلواکی، تنوع قابل توجهی در ساختار جمعیتی این قارچ گزارش کردند. به طور کلی، مطالعات انجام شده بر روی مجموعه‌های متنوعی از جدایه‌های *S. sclerotiorum* در مزارع کلزا از مناطق جغرافیایی مختلف، اطلاعات ارزشمندی را در خصوص شناخت بهتر تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی این بیمارگر فراهم می‌آورند.

نشانگرهای ریزماهوره، که به دلیل نرخ بالای جهش و ماهیت چندآلی خود شناخته شده‌اند، به‌ویژه در تحلیل‌های فیلوژنتیکی دقیق از ارزش بالایی برخوردارند (Sirjusingh and Kohn, 2001). در این تحقیق، با استفاده از ۱۰ نشانگر ریزماهوره، تعداد ۴۶ جایگاه پلی‌مورفیک (آل) در ۵۶ جدایه جمع‌آوری شده از هفت شهرستان استان مازندران شناسایی

شد. جایگاه ۴-۱۰۶ با ۱۴ باند بیشترین آلل را در میان آلل‌های تولیدی به خود اختصاص داد. همچنین، این جایگاه با مقدار تنوع ژنی نسبتاً بالا (۰/۸۸۲۰) نشان می‌دهد که دارای تنوع آللی بالایی در میان جدایه‌هاست و می‌تواند نشانگر مناسبی برای بررسی تمایز ژنتیکی باشد، زیرا تفکیک بهتری در بین جمعیت‌ها و درون جمعیت‌ها انجام می‌دهد. تعداد کل هاپلوتیپ‌ها بر اساس ترکیب‌های آللی منحصر به فرد در جایگاه‌های ریزوماهواره و شمارش هاپلوتیپ‌های متمایز موجود تعیین گردید. در مجموع، ۳۱ هاپلوتیپ از ۵۶ جدایه (۵۵/۳۶٪) شناسایی شد و ۲۲ جدایه تنها دارای یک هاپلوتیپ بودند. کلارکسون و همکاران (Clarkson et al., 2013) تعداد ۲۲۸ هاپلوتیپ SSR را در ۳۸۴ جدایه (۵۹٪) از بریتانیا شناسایی کردند، در حالی که یو و همکاران (Yu et al., 2020) تعداد ۵۲ هاپلوتیپ را در ۹۰ جدایه (۵۸٪) از شهر چونگ‌کینگ چین گزارش کردند. به‌طور مشابه، لهنر و همکاران (Lehner et al., 2015) نسبت مشابهی از هاپلوتیپ‌ها را در جمعیت‌های *S. sclerotiorum* در برزیل شناسایی کردند. براری و همکاران (Barari et al., 2017) نیز در بررسی ۵۲ جدایه از مزارع کلزا در استان مازندران تعداد ۲۷ هاپلوتیپ را گزارش کردند. همچنین، سکستون و هاوالت (Sexton and Howlett, 2004) با استفاده از هشت نشانگر ریزوماهواره بر روی ۱۵۴ جدایه *S. sclerotiorum* جمع‌آوری شده از مزارع کلزا در استرالیا، تعداد ۸۲ هاپلوتیپ (۵۳/۲۵) مختلف را شناسایی کردند که بسیاری از آن‌ها در هر جمعیت منحصربه‌فرد بودند. این یافته‌های مشابه در مناطق جغرافیایی مختلف، نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالای این قارچ بیماری‌زا است.

در این مطالعه، ۹ هاپلوتیپ بین دو یا چند جدایه مشترک بود و دو هاپلوتیپ با بیشترین فراوانی، در تمام شهرستان‌های بررسی شده مشاهده شدند. چنین الگوهایی ممکن است ناشی از چند فرآیند هم‌زمان باشد، از جمله تکثیر کلونال ژنوتیپ‌های) موفق از طریق تولیدمثل غیرجنسی و ماندگاری سختینه‌ها که امکان بقا و گسترش محلی را فراهم می‌کند. علاوه بر این، انتقال انسان‌محور (مثلاً از طریق خاک یا تجهیزات کشاورزی آلوده) می‌تواند جریان ژنی بین مزارع مجاور را تسریع کند. اگرچه شواهد مستقیم برای *S. sclerotiorum* محدود است، اما ساختار جمعیتی غالباً کلونال این قارچ نشان می‌دهد که جابجایی محلی و انسان‌محور می‌تواند نقش داشته باشد. انتقال طبیعی نیز حائز اهمیت است؛ سختینه‌ها می‌توانند مدت طولانی در شرایط مزرعه‌ای باقی بمانند و توسط آب جابه‌جا شوند، که بقای محیطی و پراکنش را تسهیل می‌کند (Pethybridge et al., 2024). آسکوسپورهای هوازداد نیز عامل مهمی در پراکنش درون مزرعه‌ای و بین مزارع هستند و نقش کلیدی در پراکنش ژنتیکی در فواصل دور دارند. این آسکوسپورها محصول آمیزش‌های جنسی میان ژنوتیپ‌های مشابه یا متفاوتند، که می‌توانند منجر به تولید نسل‌هایی با ساختار ژنتیکی مشابه شوند (Reich et al., 2024). ترکیب پراکنش هوابرد آسکوسپورها با گسترش کلونال، می‌تواند منجر به توزیع گسترده ژنوتیپ‌های مشابه شود؛ سازوکاری که با ساختار جمعیتی غالباً کلونال *S. sclerotiorum* سازگار است. گزارش‌هایی از وجود هاپلوتیپ‌های ریزوماهواره مشترک در بین جمعیت‌های مناطق مختلف از جمله چین نیز وجود دارد (Yu et al., 2020). همچنین، بر اساس گزارش همتی و همکاران (Hemmati et al., 2009)، از میان ۸۰ هاپلوتیپ شناسایی شده از استان‌های مازندران، گلستان، گیلان و اردبیل، ۱۹ هاپلوتیپ (۲۳/۷٪) در میان دست‌کم دو جمعیت منطقه‌ای مشترک بودند.

در تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها بر اساس دندروگرام (UPGMA)، جمعیت‌های بهشهر و گلوگاه کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۳۵) را نشان داده و در یک خوشه نزدیک به هم قرار گرفته‌اند. این می‌تواند نشان‌دهنده تبادل ژنی یا منشاء ژنتیکی مشترک آنها باشد. جمعیت نکا نیز در مرحله بعد به این خوشه افزوده شده و ارتباط نسبتاً نزدیکی با این دو جمعیت دارد. در گروه اول، جمعیت‌های ساری و میاندرد از سایر جمعیت‌ها متمایز شدند. در سمت دیگر، جمعیت بابل در یک خوشه مجزا قرار گرفت و بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۲۴۸) را با جویبار نشان داد.

در این پژوهش، همبستگی بین هاپلوتیپ‌های ریزوماهواره و گروه‌های سازگاری میسلیمی معنی‌دار نبود [Cramér's V] $p = 0/36$ ، $r = 0/75$. در واقع، تطابق قابل‌توجهی بین هاپلوتیپ‌های حاصل از نشانگرهای

ریزماهورهای (SSR) و گروه‌های سازگاری میسلیمی (MCGs) مشاهده نشد؛ به‌طوری‌که هر گروه سازگاری میسلیمی شامل جدایه‌هایی با هاپلوتیپ‌های متفاوت بود و در مقابل، جدایه‌های متعلق به یک هاپلوتیپ نیز الزاماً در یک گروه سازگاری قرار نداشتند. این الگو با یافته‌های پژوهش‌های پیشین (Hemmati *et al.*, 2009) هم‌راستا است که عدم ارتباط نزدیک بین MCGها و نشانگرهای SSR را گزارش کرده‌اند. یو و همکاران (Yu *et al.*, 2020) نیز در جمعیت‌های *S. sclerotiorum* شهر چونگ‌چینگ چین، ارتباط معناداری بین هاپلوتیپ‌های SSR و گروه‌های MCG نیافتند و این امر را به احتمال وقوع نوترکیبی در جمعیت نسبت دادند.

یکی از دلایل احتمالی این عدم همبستگی می‌تواند وقوع نوترکیبی ژنتیکی (جنسی یا شبه‌جنسی) در جمعیت باشد، که منجر به بازآرایی آلل‌ها در جایگاه‌های SSR می‌شود بدون آن‌که الگوهای سازگاری میسلیمی تغییر یابد. علاوه بر این، اپیستازی و اثرات برهم‌کنش ژنی نیز ممکن است سبب فرگشت مستقل ژن‌های دخیل در تعیین MCG از تنوع ژنومی در نشانگرهای SSR گردند. از سوی دیگر، SSRها اغلب نواحی غیرکدکننده ژنوم را نشان می‌دهند، در حالی‌که گروه‌های سازگاری میسلیمی تحت کنترل مجموعه‌ای از ژن‌های خاص سازگاری هتروکاریونی قرار دارند؛ بنابراین تنوع در این دو سیستم الزاماً هم‌راستا نیست. احتمال وجود جریان ژنی بین جمعیت‌ها و جهش‌های نقطه‌ای در ژن‌های کنترل‌کننده سازگاری میسلیمی نیز می‌تواند به ایجاد چنین الگوهای ناهمخوانی منجر شود.

با این حال، یافته‌های متناقضی نیز در این زمینه گزارش شده‌اند. به‌عنوان مثال، سیلوا و همکاران (Silva *et al.*, 2021) وجود همبستگی نزدیکی بین MCGs و MLLs (multi-locus lineage) را گزارش کردند. همچنین لیو و همکاران (Liu *et al.*, 2018) نشان دادند همبستگی قوی بین نتایج آزمون MCGs و نشانگرهای ریزماهوره وجود دارد. در مطالعه آلدريچ ولف و همکاران (Aldrich-Wolfe *et al.*, 2015) جدایه‌های متعلق به یک گروه سازگاری میسلیمی معمولاً دارای هاپلوتیپ‌های یکسان یا بسیار مشابه بودند، به‌طوری‌که اختلاف آن‌ها تنها در یک یا دو جایگاه از مجموع ۱۲ جایگاه پلی‌مورفیک مشاهده شد. سکستون و هاوالت (Sexton and Howlett, 2004) نیز نشان دادند که توالی‌ها یا هاپلوتیپ‌های مشابه یا نزدیک، معمولاً به گروه‌های MCG مشابه تعلق داشتند، یعنی نشانگرهای ریزماهوره با گروه‌بندی MCG همخوانی داشتند. این گزارش‌های متناقض حاکی از آن است که میزان همبستگی بین MCGها و SSRها ممکن است به جمعیت مورد بررسی، شرایط بوم‌شناختی، ساختار ژنتیکی منطقه‌ای و روش‌های تحلیلی مورد استفاده وابسته باشد.

نتایج این تحقیق اطلاعات ارزشمندی درباره تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی *S. sclerotiorum* در مزارع کلزای استان مازندران ارائه می‌دهد. یافته‌ها نشان می‌دهد که این قارچ دارای توانایی بالایی در سازگاری با شرایط محیطی مختلف است و می‌تواند تحت تأثیر تغییرات اکوسیستمی دچار تحول ژنتیکی شود. شناخت دقیق تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت این پاتوژن می‌تواند نقش کلیدی در تدوین راهبردهای مؤثر برای مدیریت بیماری ایفا کند. به‌طور کلی، برنامه‌های اصلاحی باید بر اساس شناخت دقیق ساختار ژنتیکی پاتوژن در هر منطقه طراحی شوند تا بتوانند مقاومت پایدار و مؤثری در برابر بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه ایجاد کنند. نتایج این تحقیق بر اهمیت پرورش ارقام مقاوم کلزا متناسب با ساختار ژنتیکی جمعیت‌های پاتوژن در هر منطقه تأکید دارد. انتخاب و توسعه ارقامی که به‌طور ویژه برای مقابله با ساختار ژنتیکی پاتوژن‌های بومی طراحی شده‌اند، می‌تواند اثربخشی راهکارهای مدیریت بیماری را بهبود بخشیده و از خسارات اقتصادی ناشی از آن جلوگیری کند.

References

منابع

یوسف دوست، و. و قوستا، ی. ۱۳۹۴. گروه‌های سازگار میسلیمی و بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ عامل پوسیدگی سر کلم در ارومیه. مجله علمی کشاورزی ۳۸(۱): ۶۷-۷۸.

- Ajiboye, T.O., Visser, H.G., Erasmus, E. and Schutte-Smith, M. 2025.** Recent strategies for controlling the white mould fungal pathogen (*Sclerotinia sclerotiorum*) using gene silencing, botanical fungicides and nanomaterials. *Sustainable Food Technology* 3: 612-636.
- Aldrich-Wolfe, L., Travers, S. and Nelson, B.D. 2015.** Genetic variation of *Sclerotinia sclerotiorum* from multiple crops in the north central United States. *PLoS One* 10(9): e0139188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139188>.
- Barari, H., Dalili, S.A. and Hassani, H.M. 2017.** Genetic diversity among different isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* in north of Iran. *Journal of Bacteriology and Mycology* 5(5): 387-389.
- Barari, H., Alavi, V. and Badalyan, S.M. 2012.** Genetic and morphological differences among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* by microsatellite markers, mycelial compatibility groups (MCGs) and aggressiveness in North Iran. *Romanian Agricultural Research* 29: 323-331.
- Barari, H., Dalili, S.A. and Badalyan, S.M. 2014.** Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* on different hosts in North of Iran. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 10(1): 45-57. <http://dx.doi.org/10.12816/0029873>.
- Bolton, M.D., Thomma, B.P.H.J. and Nelson, B.D. 2006.** *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and Molecular Traits of a Cosmopolitan Pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7: 1-16.
- Carbone, I., Anderson, J.B. and Kohn, L.M. 1999.** Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. *Evolution* 53: 11-21.
- Clarkson, J.P., Conventry, E., Kitchen, J., Carter, H.E. and Whipps, J.M. 2013.** Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in crop and wild hosts in the UK. *Plant Pathology* 62(2): 309-324.
- Irani, H., Heydari, A., Javan-Nikkhah, M. and Ibrahimov, A.S. 2011.** Pathogenicity variation and mycelial compatibility groups in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Plant Protection Research* 51(4) 329-336.
- Faraghati, M., Abrinbana, M. and Ghosta, Y. 2022.** Genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* populations from sunflower and cabbage in West Azarbaijan province of Iran. *Scientific Reports* 12: 9263. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13350-7>.
- Hemmati, R., Javan-Nikkhah, M. and Linde, C.C. 2009.** Population genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola in Iran. *European Journal of Plant Pathology* 125: 617-628.
- Karimi, E., Safaie, N. and Shams-Bakhsh, M. 2012.** Mycelial compatibility groupings and pathogenic diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary populations on canola in Golestan Province of Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 14: 421-434.
- Khan, M.A., Cowling, W.A., Banga, S.S., Barbetti, M.J., Cantila, A.Y., Amas, J.C., Thomas, W.J., You, M.P., Tyagi, V., Bharti, B. and Edwards, D. 2023.** Genetic and molecular analysis of stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) resistance in *Brassica napus* (canola type). *Heliyon* 9: 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19237>.
- Kohli, Y., Brunner, L.J., Yoell, H., Milgroom, M.G., Anderson, J.B., Morrall, R.A. and Kohn, L.M. 1995.** Clonal dispersal and spatially mixing in populations of the plant pathogenic fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Ecology* 4(1): 69-77.
- Kohn, L.M. 1995.** The clonal dynamic in wild and agricultural plant pathogen populations. *Canadian Journal of Botany* 73(S1): 1231-1240. <http://dx.doi.org/10.1139/b95-383>.
- Lehner, M.S., Paula Júnior, T.J., Hora Júnior, B.T., Teixeira, H., Vieira, R.F., Carneiro, J.E.S. and Mizubuti, E.S.G. 2015.** Low genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations from common bean fields in Minas Gerais State, Brazil, at regional, local and micro-scales. *Plant Pathology* 64: 921-931.
- Litholdo Júnior, C.G., Gomes, E.V., Lobo Júnior, M., Nasser, L.C.B. and Petrofeza, S. 2011.** Genetic diversity and mycelial compatibility groups of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 10(2): 868-877.
- Liu, J., Meng, Q., Zhang, Y., Xiang, H., Li, Y., Shi, F., Ma, L., Liu, C., Liu, Y., Su, B. and Li, Z. 2018.** Mycelial compatibility group and genetic variation of sunflower *Sclerotinia sclerotiorum* in Northeast China. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 102: 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2018.03.006>.
- Liu, K. and Muse, S.V. 2005.** PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21(9): 2128-2129. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti282>.
- McDonald, B.A. and Linde, C. 2002.** Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349-379. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>.

- Nei, M. 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.
- Pakdaman, B.S. and Goltapeh, E.M. 2007.** *In vitro* studies on the integrated control of rapeseed white stem rot disease through the application of herbicides and *Trichoderma* species. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(1): 7-12.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2012.** GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-An update. *Bioinformatics* 28(19): 2537-2539.
- Pethybridge, S.J., Murphy, S., Lund, M. and Kikkert, J.R. 2024.** Survival of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia in central New York. *Plant Disease* 108(5): 1165-1172.
- Reich, J., McLaren, D.L., Kim, Y.M., Wally, O., Yevtushenko, D., Hamelin, R. and Chatterton, S. 2024.** Predicting airborne ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* through machine learning and statistical methods. *Plant Pathology* 73(6): 1586-1601.
- Rohlf, F.J. 2009.** NTSYSpc: Numerical taxonomy system (Version 2.2). Exeter Software, Setauket, NY, USA.
- Saharan, G.S. and Mehta, N. 2008.** *Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management*. Springer Science + Business Media B.V., Amsterdam.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. 2001.** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schafer, M.R. and Kohn, L.M. 2006.** An optimized method for mycelial compatibility testing in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia* 98(4): 593-597. <https://doi.org/10.3852/mycologia.98.4.593>.
- Sexton, A.C. and Howlett, B.J. 2004.** Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. *Current Genetics* 46(6):357-65.
- Silva, R.A., Ferro, C.G., Lehner, M., Jr, T.J.P. and Mizubuti, E.S.G. 2021.** The population of *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil is structured by mycelial compatibility groups. *Plant Disease* 105: 3376-3384.
- Sirjusingh, C. and Kohn, L.M. 2001.** Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Ecology Notes* 1(4): 267-269. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00102.x>.
- Tóthová, M., Máčajová, P. and Tóth, P. 2021.** Mycelial incompatibility of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from a single rapeseed field in Slovakia. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 11(2). <https://doi.org/10.15414/jmbfs.3369>.
- Tok, F.M., Derviş, S. and Arslan, M. 2016.** Analysis of genetic diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* from eggplant by mycelial compatibility, random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) analyses. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 30(5): 921_928.
- Xu, D.F., Li, X.L., Pan, Y.M., Dai, Y.L., Li, P., Chen, F.X., Zhang, H.J., Guo, M. and Gao, Z.M. 2014.** Genetic diversity and pathogenicity differentiation of *Sclerotinia sclerotiorum* on rapeseed (*Brassica napus* L.) in Anhui Province, China. *Genetics and Molecular Research* 13(4): 10704-10713. <https://doi.org/10.4238/2014.december.18.12>.
- Yu, Y., Cai, J., Ma, L., Huang, Z., Wang, Y., Fang, A., Yang, Y., Qing, L. and Bi, C. 2020.** Population structure and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* from rapeseed (*Brassica napus*) in Chongqing City. *Plant Disease* 104: 1201-1206.

Mycelial Compatibility Groups and Genetic Diversity in Populations of *Sclerotinia sclerotiorum*, the Causal Agent of Sclerotinia Stem Rot of Rapeseed in Mazandaran Province

S. Mohseni-chamazkoti¹, S. Rezaee^{2*}, S.A. Dalili³ and M. Aldaghi³

Received: 22 Oct., 2024

Accepted: 11 Jan., 2025

ABSTRACT

Sclerotinia stem rot, caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, is one of the most important diseases of rapeseed in Iran. To assess the genetic diversity of *S. sclerotiorum* isolates, sampling was conducted from rapeseed fields in different regions of Mazandaran Province. A total of 56 isolates were selected based on their geographical distribution. Then, mycelial compatibility groups (MCGs) and simple sequence repeat (SSR) markers were used to analyze the genetic structure of these distinct isolates. In total, 32 MCGs were identified, of which 59.4% contained only a single isolate, while the remaining groups consisted of 2 to 7 isolates. Molecular analysis was performed using 10 pairs of microsatellite primers. In total, 31 microsatellite haplotypes were identified across all populations, with a few haplotypes found at high frequencies. Gene diversity among the seven populations ranged from 0.4120 to 0.5111. The highest and lowest levels of genetic diversity among the populations were observed in the Behshahr and Sari counties, respectively. No significant association was found between microsatellite haplotypes and mycelial compatibility groups ($V = 0.75$, $p = 0.36$). The findings of this study will be beneficial for breeding resistant cultivars and developing disease management strategies for Sclerotinia stem rot.

Key words: Genetic diversity, Mycelial compatibility, Microsatellite markers, Oilseed rape, Sclerotinia stem rot

1 and 2. PhD. Student and Assistant Professor, respectively, Department of Plant Protection, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Agricultural and Natural Resources Research Centre of Mazandaran Province, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Mazandaran, Sari, Iran

Corresponding author: srezaee@srbiau.ac.ir