

شناسایی گونه‌های پی تیوم استان همدان و ارزیابی تنوع آن‌ها با استفاده از نشانگر RFLP

پیمان آباد*^۱، دوستمراد ظفری^۱، منصوره میرابوالفتحی^۲

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۱۷

چکیده

به منظور بررسی تنوع و میزان قرابت و تفاوت‌های ژنتیکی جدایه های شبه قارچ پی تیوم از شهرها و مناطق مختلف استان همدان، بازدید به عمل آمد و تعداد ۱۵۰ جدایه جمع آوری و مورد بررسی قرار گرفت که بر اساس ریخت‌شناسی ۱۲ گونه شناسایی شد. تعداد ۸ جدایه پی تیوم که دارای اسپورانژیوم گرد بودند انتخاب و برای مقایسه آن‌ها از نشانگر RFLP استفاده گردید که در نهایت از تاثیر آنزیم‌های برشی روی جدایه‌ها، ۳۶ باند بدست آمد که طول این نواحی از ۳۵۰ تا ۱۰۰۰ کیلو جفت باز متغیر بود. جدایه‌ها در ۳ گروه و ۷ کلاذ قرار گرفتند. گونه‌های *Pythium* group G و *P. tracheiphilum* شباهت ۱۰۰ درصدی را نشان دادند که احتمالاً هر دو جدایه از یک دودمان ژنتیکی هستند. بیشترین تفاوت درون گونه‌ای را *P. irregulare* و *P. pyrilobum* به ترتیب با ۸۰ و ۶۵ درصد آشکار ساختند.

واژه های کلیدی: پی تیوم، همدان، RFLP.

۱- گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

۲- مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مقاله: peymanabad@yahoo.com

مقدمه:

جنس پی تیوم در سال ۱۸۵۸ توسط پرینگ‌شیم نامگذاری گردید. این جنس در خانواده پی تیاسه (Pythiaceae)، راسته پرونوسپورالس (Perenosporales) و رده اوومیسیت (Oomycetes) قرار دارد و در سرتاسر جهان گسترده شده است (Martin, 1995). استفاده از روش های مولکولی به خصوص آنالیز DNA در چند سال اخیر، توانایی محققان را برای شناسایی و تشخیص درست عوامل بیمارگر خاکزاد افزایش داده است. پی تیوم یکی از شبه قارچهایی است که بدلیل وجود اندام های جنسی و غیرجنسی متنوع، تشخیص صحیح آن با استفاده از روش های سنتی مشکل می باشد. یکی از این روش ها RFLP است که برای تنوع درون گونه ای و بین گونه ای پی تیوم به کار می رود (Wang and White, 1997). رافین و همکاران در سال ۱۹۹۵ (Rafin et al., 1995) ۲۳ گونه پی تیوم را با RFLP شناسایی کردند. وانگ و وایت (Wang and White, 1997) با نشانگر RFLP توانستند ۳۶ گونه پی تیوم را شناسایی کنند. هاروی و همکاران (Harvey et al., 2001) تنوع ژنتیکی ۳۴ جدایه *P. irregulare* را با استفاده از نشانگر مولکولی RFLP مطالعه کردند. لوسکو و دی کوک (Levesque and deCock, 2003) تکامل مولکولی و طبقه بندی گونه های پی تیوم را بررسی کردند. مک لود و همکاران (McLeod et al., 2009) ۸۵ جدایه پی تیوم را از نظر مولکولی مورد مطالعه دقیق قرار دادند. در ایران عسکری و همکاران (۲۰۱۰) از روش AFLP برای تفکیک گونه های پی تیوم استفاده کردند. فتحی و همکاران (Fattahi et al., 2010) نیز با استفاده از RAPD توانستند جدایه های *P. aphanidermatum* را در استان همدان شناسایی کنند. هدف از انجام این پژوهش جداسازی و شناسایی گونه های پی تیوم در استان همدان و بررسی تنوع بین آنها بود.

مواد و روش ها:

الف) بررسی های مرفولوژیکی

جمع آوری نمونه ها از اردیبهشت سال ۱۳۸۶ آغاز شد و در تابستان ۱۳۸۷ پایان یافت. نمونه ها از اندام های مشکوک به آلودگی، جمع آوری شدند (جدول ۱). ۱۵۰ جدایه پس از خالص سازی، روی محیط کشت CMA (Corn meal agar) و PDA (Potato dextrose agar) کشت گردید. برای تهیه اسلاید میکروسکوپی از کاتن بلو (Cotton blue) و لاکتوفنول (Lactophenol) استفاده شد. از میکروسکوپ نوری Leica DMLB ساخت کشور آلمان برای تشخیص گونه ها و برای اندازه گیری اندام های مختلف قارچ، از میکروسکوپ نوری مدرج LEITZ مجهز به لنز مدرج ساخت کشور پرتغال استفاده گردید. برای عکس برداری میکروسکوپی از کامپیوتر استفاده شد. با استفاده از اسلایدهای تهیه شده، شکل اندام های زایشی و غیرجنسی مانند اسپورانژیوم (Sporangium)، آنترییدیوم (Antheridium)، اووگونیوم (Oogonium) و اووسپور (Oospore) در هر گونه به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به لوله ترسیم با بزرگنمایی ۴۰ برابر رسم گردید. اسپورانژیوم ها ۷-۲ روز، آنترییدیوم و اووگونیوم ۲۰-۲ روز و اووسپورها ۳۰-۲ روز پس از کشت مورد بررسی قرار گرفتند. برای تشخیص گونه های پی تیوم از کلید *واندرپلات-نیتیرینک* (van der Plaats-Niterink, 1981) و *دیک* (Dick, 1990) استفاده گردید.

جدول ۱- گونه های شناسایی شده، مکان های نمونه برداری، تعداد و میزبان های آن ها در استان همدان

تعداد نمونه	میزبان ها	محل جدا شده	گونه های شناسایی شده
۱۲	چغندر قند	همدان-اسداباد-رزن	<i>P. aphanidermatum</i>
۳	بادنجان	همدان	<i>P. deliense</i>
۳	<i>Plumbago europaea</i>	همدان	<i>P. hydnosporum</i>
۱۰	مریم گلی	همدان	<i>P. irregulare</i>
۲۵	چغندر قند	همدان-اسداباد-رزن	<i>P. oligandrum</i>
۳	رز و اطلسی	همدان	<i>P. perplexum</i>
۳	فلفل	همدان	<i>P. pyrilobum</i>
۴	شاهبیک (<i>Atropa belladonna</i>)	همدان	<i>P. salinum</i>
۳	رز	همدان	<i>P. macrosporum</i>
۳۴	لوبیا-سیب زمینی-گوجه فرنگی- خیار-گردو-سیب	همدان-اسداباد-نهاد-ملایر-تویسرکان- جورقان-قهاوند-سرکان-رزن	<i>P. ultimum var ultimum</i>
۴۲	چغندر قند-باقلا-زردآلو-سیب- گردو	همدان-اسداباد-نهاد-ملایر-تویسرکان- جورقان-قهاوند-سرکان-رزن	<i>Pythium group G</i>
۱۸	<i>Aspidistra elatior</i>	همدان	<i>P. tracheiphilum</i>

ب) بررسی های مولکولی

تعداد ۸ جدایه پی تیوم (*P. salinum*, *P. irregulare*, *P. perplexum*, *P. pyrilobum*, *P. ultimum var ultimum* و *Pythium group G* و *P. tracheiphilum macrosporum*) که دارای اسپورانژیوم گرد بودند (از بین گونه های شناسایی شده ۸ گونه دارای مشابهت بیشتری از نظر ریخت شناسی بودند)، برای بررسی های مولکولی انتخاب شدند.

۱) استخراج DNA ژنومی

جدایه ها ابتدا در محیط کشت CMA کشت داده شدند. برای تهیه محیط کشت مایع ۱۰ گرم ساکارز، ۱ گرم عصاره مخمر در یک لیتر آب مقطر ریخته و بعد از همگن کردن این محیط کشت در حمام بن ماری، در مرحله بعدی، محیط کشت در حجم های ۲۰۰ میلی لیتری در ارلن های ۵۰۰ میلی لیتری تقسیم شد (وانگ و وایت، ۱۹۹۷). سپس ارلن ها در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه سترون گردید. از هر جدایه کشت داده شده در محیط کشت CMA، سه قرص میسیلیومی به قطر تقریبی یک سانتی متر در ارلن های حاوی محیط کشت مایع قرار داده شد. سپس ارلن ها به شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه منتقل شدند. بعد از مدت ۱۰-۷ روز، محیط مایع با استفاده از کاغذ صافی، صاف شده و میسیلیوم به دست آمده، دوبار با آب مقطر سترون شسته شد و پس از آب گیری روی کاغذ صافی به پتری های پلاستیکی منتقل شدند. درب تشتک ها با کمک پارافیلیم مسدود و تا زمان استخراج DNA در فریزر نگهداری شدند. از روش اصلاح شده موری و تامپسون جهت استخراج DNA استفاده گردید (وانگ و وایت، ۱۹۹۷).

۲) تعیین کمیت و کیفیت DNA

برای این کار از روش الکتروفورز ژل آگاروز استفاده گردید. ابتدا ژل آگاروز یک درصد تهیه شد، سپس غلظت DNA هر نمونه در مقایسه با غلظت DNA استاندارد نمونه تجارتي فاژ لاندن تخمین زده شد. این DNA با دستور شرکت سازنده به گونه ای تهیه می شود که اگر یک میکرولیتر از آن در داخل چاهک ریخته شود، باند ایجاد شده بر روی ژل آگاروز، غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر را نشان می دهد. برای هر نمونه، ۳ میکرولیتر DNA استخراج شده با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط گردید و در چاهک ژل آگاروز یک درصد در بافر TAE ریخته شد. ژل آگاروز به مدت ۴ ساعت و با ولتاژ ثابت ۲۵ ولت

بررسی توانایی آنتاگونیستی قارچ های اندوفیت ریشه و گونه های تریکودرما بر ...

الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید به غلظت یک میلی گرم در لیتر به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه، DNA در زیر نور ماوراء بنفش (UV) در دستگاه Gel Document مشاهده و عکس برداری انجام شد.

۳) PCR-RFLP

برای آغازگرهای اختصاصی نیز محلول پایه مطابق جدول ۲ تهیه گردید. در ابتدا ۵ میکرولیتر DNA مربوط به هر نمونه در داخل میکروتیوب های مخصوص PCR ریخته شده و به یخچال منتقل شد. بلافاصله محلول پایه تهیه شد و ۴۵ میکرولیتر از آن به هر میکروتیوب حاوی DNA اضافه گردید. جهت تکثیر از دستگاه ترموسایکلر شرکت Techne مدل TC-512 استفاده گردید. در آخرین چرخه حرارتی و پس از مرحله گسترش نهایی دمای ترموسایکلر در دمای ۴°C برای مدت ۲۴ ساعت تنظیم گردید که این حالت موجب حفظ و نگهداری محصول PCR می شود. هم چنین محصول PCR را می توان در دمای ۲۰°C به مدت چندروز نگهداری نمود تا در فرصت مناسب آن را الکتروفورز نمود. چرخه دمایی برای واکنش PCR و تکثیر قطعات طبق جدول ۳ تنظیم گردید.

جدول ۲- مواد لازم و مقدار آن برای تهیه محلول پایه آغازگرهای ITS4 , ITS5

ماده	غلظت پایه	غلظت نهایی	برای یک واکنش
آب دو بار تقطیر سترون	-	-	۲۶/۰ μl
بافر PCR	X۱۰	X۱	۱۵ μl
کلرید منیزیم (MgCl2)	mM۵۰	mM۲/۵	۲/۵ μl
dNTPs	mM۱۰	mM۰/۲	۱ μl
آغازگر معکوس	pmol / μl۱۰	pmol۵۰	۱۵ μl
آغازگر پیش برنده	pmol / μl۱۰	pmol۵۰	۱۵ μl
آنزیم DNA Taq پلیمرز	unit / μl۵	unit۲/۵	۰/۵ μl
حجم نهایی	-	-	۴۵ μl

جدول ۳- زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف PCR با آغازگرهای ITS4 و ITS5

تعداد چرخه	مرحله انجام شده	زمان	درجه حرارت (°C)
۱ چرخه	واسرشت اولیه	۵ دقیقه	۹۵
	واسرشت	۱ دقیقه	۹۵
۳۵ چرخه	اتصال	۳۵ ثانیه	۵۰
	گسترش	۲ دقیقه	۷۲
۱ چرخه	گسترش نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲

۴) آغازگرهای اختصاصی

برای انجام آزمایش های PCR از آغازگرهای اختصاصی شرکت DNA Technology A/S استفاده گردید. آغازگرها درون لوله به صورت انجماد خشک بودند و با آب دوبار تقطیر سترون به غلظت های اولیه در دستور کار، رقیق شده و سپس دوباره به غلظت ۱۰ pmol/μl رقیق گردیدند. سپس آغازگرهای رقیق شده در دمای ۲۰°C نگهداری شده و فقط در موقع استفاده ذوب شده و دوباره به فریزر انتقال یافتند. نام و توالی آغازگرهای اختصاصی استفاده شده در زیر آمده است.

ITS 5: 5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3'

ITS 4: 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'

۵) روش PCR-RFLP در نواحی ITS1 و ITS2 و ژن S ۵/۸

پس از انجام PCR اولیه با آغازگرهای اختصاصی ITS4 و ITS5، ده میکرولیتر از محصول به دست آمده، با آنزیم‌های برشی Cfo I، Hae III و Msp I مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. در مرحله اول بعد از تکثیر، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR با ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری شده مخلوط گردیده و روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد در بافر TBE، نمونه‌ها در چاهک‌ها بارگیری شدند. دستگاه الکتروفورز به منبع تأمین نیروی برق با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت متصل گردید. پس از گذشت حدود ۲/۵ ساعت، جریان برق قطع گردید پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید به غلظت یک میلی‌گرم در لیتر به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه، DNA در زیر نور ماوراء بنفش (UV) در دستگاه Gel Document مشاهده و عکس‌برداری انجام شد (جدول ۴). شرایط برش آنزیمی برای مخلوط واکنش، برای تمام آنزیم‌های به کار رفته ۴ ساعت در دمای ۳۷°C بود. بعد از هضم آنزیمی، جهت مشاهده باندهای حاصل از واکنش آنزیم‌های برشی، ابتدا حدود ۸ میکرولیتر DNA برش یافته با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط گردیده و روی ژل آگاروز یک درصد در بافر TBE، نمونه‌ها در چاهک بارگیری شدند. ولتاژ برق و زمان آن به صورت ۱۰۰ ولت و یک ساعت و ۴۵ دقیقه و یا ۸۰ ولت و ۲/۵ ساعت تنظیم شد. سپس ژل رنگ‌آمیزی و عکس‌برداری شد. برای وضوح بهتر باندها در چاهک‌های بزرگ‌تر، ۱۲ میکرولیتر DNA برش یافته با ۴ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط گردیده و مراحل قبلی تکرار گردید. پس از انجام آزمایش RFLP وجود یا عدم وجود باند با اعداد یک و صفر برای هر جدایه مشخص شد. جهت تجزیه و تحلیل باندها از نرم افزار NT SYS V.2.2 روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه جاکارد استفاده شد.

جدول ۴- مواد لازم و مقدار آن‌ها برای PCR-RFLP

ماده	غلظت
PCR بافتنر یافته با DNA	۱۰ μl
بافر ۱۰ X	۳ μl
آنزیم برشی با غلظت ۱۰ unit / μl	۰/۵ μl
آب دوبار تقطیر سترون	۱۶/۵ μl

نتایج و بحث:

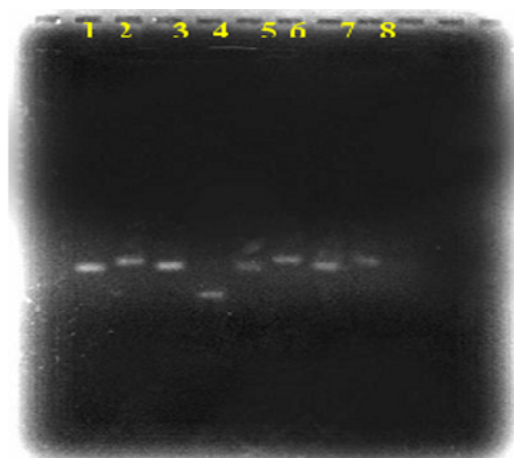
در این بررسی از مجموع ۱۵۰ جدایه پی‌تیوم، به کمک بررسی‌های ریخت‌شناسی ۱۲ گونه تشخیص داده شد.

PCR-RFLP (۱)

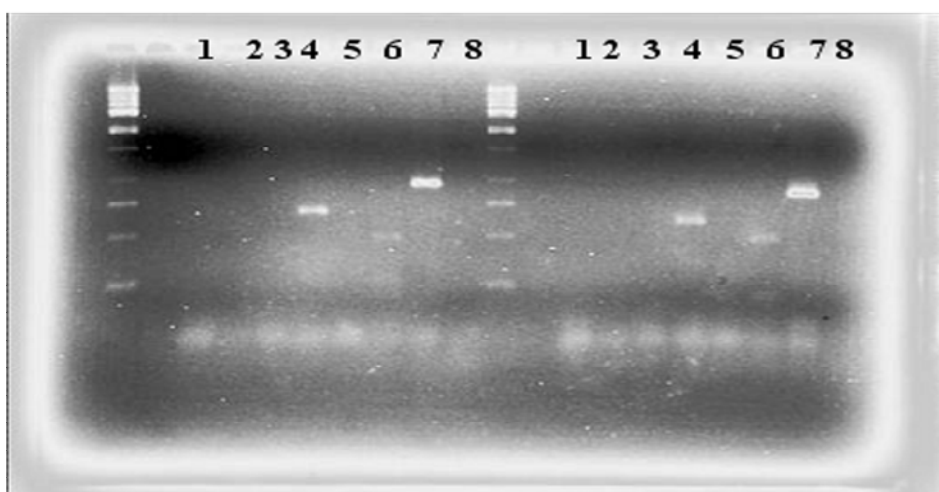
در این نشانگر ابتدا دی‌ان‌ای به دست آمده از ۸ گونه با آغازگرهای اختصاصی ITS4 و ITS5 تکثیر شد (شکل ۱). در مرحله بعد محصول PCR با آنزیم‌های برشی Cfo I، Hae III و Msp I برش داده شد. از برش با آنزیم‌های Cfo I، Hae III و Msp I به ترتیب ۱۰، ۱۴ و ۱۲ باند و در مجموع ۳۶ باند به دست آمد که طول این نواحی از ۳۵۰ تا ۱۰۰۰ کیلو جفت باز متغیر بود (شکل ۲ و ۳؛ جدول ۵). براساس نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار NT SYS V.2.2 و با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA بیشترین همبستگی بین داده‌ها با استفاده از ضریب جاکارد به دست آمد (شکل ۴).

جدول ۵- تعداد باندهای ایجاد شده با آنزیم‌های برشی به کار رفته در نشانگر PCR-RFLP

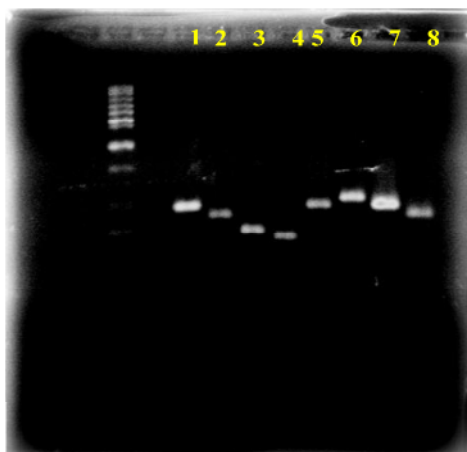
آنزیم برشی	تعداد باندهای ایجاد شده	تعداد باندهای چندشکل	درصد باندهای چندشکل
Cfo I	۱۰	۸	۸۰٪
Hae III	۱۴	۰	۰٪
Msp I	۱۲	۷	۵۸٪
کل آنزیم‌ها	۳۶	۱۵	۴۱٪



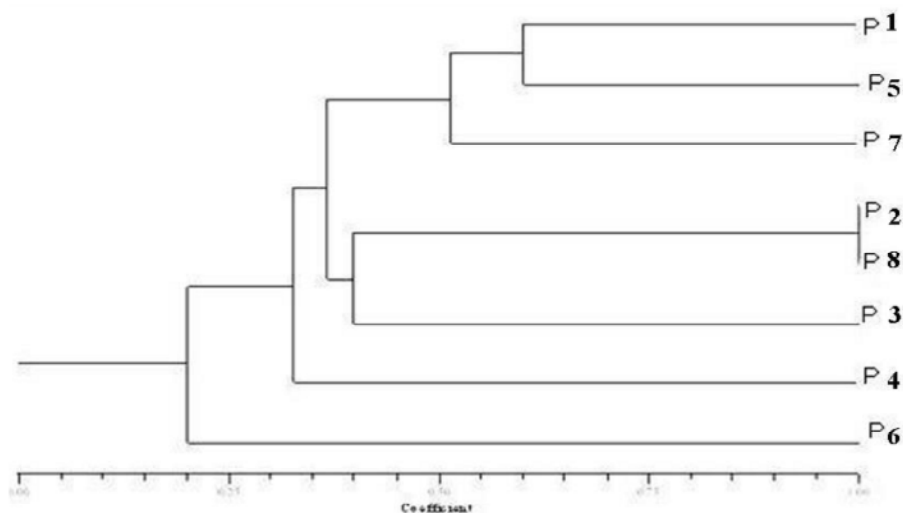
شکل ۱- باند ایجاد شده از تکثیر نواحی ITS 1, ITS 2 و ژن 5.8S
1- *P. salinum* 2- *P. tracheiphilum* 3- *P. ultimum* 4- *P. irregulare* 5- *P. perplexum*
6- *P. pyrilobum* 7- *P. macrosporum* 8- *Pythium* group G.



شکل ۲- الگوی برشی نواحی ITS 1, ITS 2 و ژن 5.8S با آنزیم Msp I (سمت چپ) و آنزیم برشی Cfo I (سمت راست)
1- *P. salinum* 2- *P. tracheiphilum* 3- *P. ultimum* 4- *P. irregulare* 5- *P. perplexum*
6- *P. pyrilobum* 7- *P. macrosporum* 8- *Pythium* group G.



شکل ۳- الگوی برشی نواحی ITS 1, ITS 2 و ژن S ۵/۸ با آنزیم Hae III.
 1- *P. salinum* 2- *P. tracheiphilum* 3- *P. ultimum* 4- *P. irregulare* 5- *P. perplexum*
 6- *P. pyrilobum* 7- *P. macrosporum* 8- *Pythium* group G.



شکل ۴- دندروگرام حاصل از نشانگر PCR-RFLP با استفاده از ضریب جاکارد.

۲) شناسایی گونه‌ها

- جدایه‌های ۱ و ۵ براساس مطالعات ریخت‌شناسی به ترتیب به‌عنوان گونه‌های *P. salinum* و *P. perplexum* تشخیص داده شده بودند. این دو گونه از نظر ریخت‌شناسی هر دو دارای ریشه‌های به‌نسبت هم‌اندازه در حدود ۸ میکرومتر، اسپورانژیوم‌های گرد و ۲۳ میکرومتری و دارای اووگونیم با دیواره صاف و به قطر ۲۲ میکرومتر هستند. یکی از تفاوت‌های عمده بین این دو گونه شکل اووسپورهاست که گونه *P. salinum* دارای اووسپور پلروتیک ولی گونه *P. perplexum* دارای اووسپور اپلروتیک می‌باشد (واندرپلات-نیتزینک، ۱۹۸۱؛ دیک ۱۹۹۰). نتایج نشانگر RFLP نشان داد که این دو گونه در حدود ۶۰ درصد شباهت را نشان می‌دهند. یکی دیگر از گونه‌هایی که به *P. perplexum* شباهت زیاد دارد گونه *P. vexans* می‌باشد. تفاوت آن‌ها در میانگین اندازه اووسپور است که در *P. perplexum* ۲۱ میکرومتر ولی در *P. vexans* میانگین اندازه اووسپور ۱۷ میکرومتر می‌باشد (واندرپلات-نیتزینک، ۱۹۸۱). گالاند و پل در سال ۲۰۰۱ (Galland and Paul, 2001) گونه *P. perplexum*

بررسی توانایی آنتاگونیستی قارچ های اندوفیت ریشه و گونه های تریکودرما بر ...

را که در فرانسه عامل مرگ گیاهچه خیار بود، از خاک جدا کرده و با تعیین توالی منطقه ITS1-rDNA، آن را شناسایی کردند. این گونه پیشتر در این کشور *P. vexans* معرفی شده بود.

- جدایه ۷ که گونه *P. macrosporum* تشخیص داده شده بود دارای ریشه‌هایی با قطر ۸ میکرومتر و اسپورانژیوم گرد و به قطر ۲۴ میکرومتر می‌باشد که از نظر ریخت‌شناسی با گونه‌های *P. salinum* و *P. perplexum* شباهت دارد (واندرپلات-نیتزینک، ۱۹۸۱؛ دیک ۱۹۹۰). بررسی مولکولی شباهت این گونه را با گونه‌های بالا ۵۵ درصد نشان داد. تفاوت این گونه با دو گونه نام‌برده شده در اندازه اووگونیوم و نوع آنتریدیوم و اووسپور می‌باشد. این گونه پیشتر توسط نگارندگان از ایران گزارش شده بود (Askari et al., 2010).

- جدایه‌های ۲ و ۸ که براساس مطالعات ریخت‌شناسی به ترتیب به‌عنوان گونه‌های *P. tracheiphilum* و *Pythium* group G تشخیص داده شده بودند شباهت ۱۰۰ درصد را نشان می‌دادند که شاید شباهت عینی این دو گونه نشانگر وابستگی تکاملی آن دو به هم باشد. امروزه پژوهشگران اوومیست‌شناس بر این باورند که گونه‌هایی از پی‌تیوم که اووگونیوم و آنتریدیوم تولید نمی‌کنند، یعنی پی‌تیوم گروه G, T, F و HS، قسمتی از مرحله غیرجنسی دیگر گونه‌های پی‌تیوم هستند از جمله کاگی-یاما و همکاران (Kageyama et al., 1997) ثابت کردند که پی‌تیوم HS جدایه غیرجنسی گونه *P. ultimum* می‌باشد.

- جدایه ۳ که *P. ultimum* var *ultimum* تشخیص داده شده بود از نظر داشتن اسپورانژیوم گرد، اووسپور اپلروتیک و دیواره اووسپور با بیش از ۲ میکرومتر ضخامت، به گونه *P. tracheiphilum* شباهت کمی دارد. این دو گونه دارای تفاوت‌های بسیار زیادی از نظر ریخت‌شناسی هستند که از جمله آن‌ها نوع آنتریدیوم و نحوه تماس آن با اووگونیوم، اندازه اووگونیوم، اسپورانژیوم و اووسپور می‌باشد (واندرپلات-نیتزینک، ۱۹۸۱ و دیک ۱۹۹۰). نشانگر مولکولی تفاوت‌های بسیار زیاد این دو گونه را از نظر ریخت‌شناسی تایید کرد. نشانگر RFLP ثابت کرد که گونه‌های *P. tracheiphilum* و *P. ultimum* var *ultimum* شباهت ۴۰ درصد را نشان می‌دهند و دارای تفاوت‌های بسیاری هستند. کاگی‌یاما و همکاران نیز در سال ۱۹۹۷ توانستند گونه *P. ultimum* را با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه شناسایی کنند. آن‌ها در این روش منطقه ITS-rDNA، *Pythium* group HS و تعدادی دیگر از گونه‌های پی‌تیوم را تعیین توالی کردند. توالی منطقه ITS-rDNA برای گونه‌های *P. ultimum* و *Pythium* group HS یکسان و شبیه به هم بود. این پژوهشگران در نهایت اعلام کردند که *Pythium* group HS جدایه غیرجنسی *P. ultimum* می‌باشد. کاگی‌یاما و همکاران در سال ۱۹۹۸ ویژگی‌های ریخت‌شناسی گونه‌های *P. ultimum* و *Pythium* group HS را مطالعه کردند و در مرحله بعد، این دو گونه را با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و RFLP مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمایشات مولکولی نشان داد که این دو گونه بسیار به هم نزدیک هستند و تفاوت بین گونه‌ای نیز ندارند.

- جدایه ۴ که براساس مطالعات ریخت‌شناسی به‌عنوان گونه *P. irregulare* تشخیص داده شده بود با گونه‌های *P. irregularum*, *P. perplexum*, *P. macrosporum*, *P. tracheiphilum*, *P. ultimum* و *Pythium* group G دارای تفاوت‌های بسیار اساسی و فقط در حدود ۳۵ درصد شباهت را نشان داد. امروزه تعدادی از پژوهشگران اوومیست‌شناس با استفاده از نشانگرهای مولکولی ثابت کرده‌اند که گونه *P. irregulare* تنها یک گونه نیست و ترکیبی از چند گونه است. ماتسوموتو و همکاران (Matsumoto et al., 2000) گونه *P. irregulare* را مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها در این مطالعه ۴۷ جدایه *P. irregulare* را از نظر ریخت‌شناسی، فیزیولوژی و مولکولی مقایسه کردند. نتایج آزمایشات مولکولی با استفاده از نشانگرهای RAPD و RFLP نشان داد که این جدایه‌ها به ۴ گروه تقسیم می‌شوند. گروه ۱ و ۲ به ترتیب شامل ۳۲ و ۸ جدایه و گروه ۳ و ۴ مجموعاً ۷ جدایه را تشکیل دادند. گروه ۱ اووگونیوم و اووسپور کوچک‌تر از ۳ گروه دیگر داشت. در گروه ۱ و ۲ اووگونیوم معمولاً با زوائد چندتایی در حالی که گروه‌های ۳ و ۴ دارای فقط یک زائده اووگونیومی بودند. گارزون و همکاران (Garzon et al., 2005) برای تشخیص گونه‌های پی‌تیوم از نشانگر AFLP استفاده کردند. آن‌ها در این تحقیق ۸۷ جدایه پی‌تیوم را از مناطق مختلف جهان جمع‌آوری کرده و در نهایت با استفاده از نشانگر AFLP توانستند گونه‌های *P. aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. myriophyllum*, *P. heterothallicum*, *P. torulosum*, *P. dissotocum*, *P. spinosum*, *P. vexans* و *P. irregulare* را شناسایی

کنند. آن‌ها در این پژوهش اعلام کردند که در بین گونه‌های پی‌تیوم، *P. aphanidermatum* کمترین تنوع درون‌گونه‌ای را با ۱۵٪ و بیشترین تنوع درون‌گونه‌ای را با ۶۴٪ نشان داد. گارزون و همکاران (۲۰۰۵) گونه *P. irregulare* را از نظر مولکولی مورد بررسی و مطالعه قرار دادند. هدف این پژوهش پاسخ به این سوال بود که "آیا گونه *P. irregulare* یک گونه است یا ترکیبی از چند گونه؟". آن‌ها در این تحقیق ۶۸ جدایه این گونه را از سراسر آمریکا جمع‌آوری کرده و به‌همراه گونه‌های *P. spinosum* و *P. sylvaticum* و به‌وسیله نشانگر AFLP و تعیین توالی ITS-rDNA و ژن COX II تجزیه و تحلیل کردند. نتایج آزمایشات مولکولی ثابت کرد که ۴۹ جدایه از مجموع ۶۸ جدایه، متعلق به گونه *P. irregulare* نیستند و با گونه‌های *P. spinosum* و *P. sylvaticum* ارتباط نزدیکی دارند. گارزون و همکاران در سال ۲۰۰۷ گونه *P. irregulare* را مورد بررسی دقیق مولکولی و میکروسکوپی قرار دادند. آن‌ها پس از مطالعه و آزمایشات فراوان مولکولی توانستند ثابت کنند که این گونه تنها یک گونه نیست و ترکیبی از چند گونه است. براین اساس گونه جدید *P. cryptoirregulare* از درون جدایه‌های *P. irregulare* و براساس آزمایشات مولکولی به‌دست آمد.

- جدایه ۶ که *P. pyrilobum* تشخیص داده شد، در سال ۱۳۸۹ توسط نگارندگان برای اولین بار از ایران گزارش شده است (Askari et al., 2010). این گونه در بررسی‌های مولکولی و در مقایسه با دیگر گونه‌های پی‌تیوم دارای اسپورانژیوم گرد، کمترین شباهت را نشان داد. این گونه دارای سه نوع اسپورانژیوم گرد، گلابی‌شکل و رشته‌ای متورم می‌باشد، هم‌چنین زئوسپورهای بزرگ، شکل اووگونیم‌ها گرد تا گلابی‌شکل و دارای دو نوع اووسپور اپروتیک و پلروتیک از ویژگی‌های آشکار این گونه بوده که از این نظر با دیگر گونه‌های پی‌تیوم متفاوت است. نشانگر RFLP نیز ثابت کرد این گونه با ۷ گونه دیگر فقط ۲۰ درصد شباهت دارد. واندرپلات-نیتزینک نیز در سال ۱۹۸۱ این گونه را در گروه پی‌تیوم‌های دارای اسپورانژیوم رشته‌ای متورم و در مرز بین گونه‌های دارای اسپورانژیوم رشته‌ای و گونه‌های دارای اسپورانژیوم گرد طبقه‌بندی کرد. در ادامه پیشنهاد می‌گردد تا گونه *Pythium group G* دقیق‌تر بررسی شده و چرخه جنسی آن در ایران مطالعه گردد.

سپاسگزاری

نگارندگان بدین وسیله از همکاری و مساعدت علمی خانم مریم فضلی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

Reference:

1. Askari, S., Rohani, H. Falahati Rastegar, M., Mehdikhani Moghadam, E. and Mokaram Hesar, A. 2010. Identification of *Pythium* species from vegetable crops in Razavi province using AFLP marker. 19th Iranian Plant Protection Congress, 31 July-3 August, Tehran, Iran.
2. Dick, M. W. (1990). Key to *Pythium*. U. K, Reading University Press.
3. Fattahi, Sh., Zafari, D. and Mahmoudi, S.B. 2010. Genetic diversity and identification of *Pythium aphanidermatum* isolates using RAPD-PCR. 19th Iranian Plant Protection Congress, 31 July-3 August, Tehran, Iran.
4. Galland, D., and Paul, B. (2001). *Pythium perplexum* isolated from soil in France: morphology, molecular characterisation and biological control. Microbiological Research 156: 185-189.
5. Garzon, C. D., Geiser, D. M., and Moorman, G. W. (2005). Amplified fragment length polymorphism analysis and internal transcribed spacer and cox II sequences reveal a species boundary within *Pythium irregulare*. Phytopathology 95: 1489-1498.
6. Garzon, C. D., Geiser, D. M., and Moorman, G. W. (2005). Diagnosis and population analysis of *Pythium* species using AFLP fingerprinting. Plant disease 89: 81-89.
7. Garzon, C. D., Yanez, J. M., and Moorman, G. W. (2007). *Pythium* cryptoirregulare, a new species within the *P. irregulare* complex. Mycologia 99: 291-301.
8. Harvey, P. R., Butterworth, P. J., Hawke, B. G., and Pankhurst, C. E. (2001). Genetic and pathogenic variation among cereal, medic and sub-clover isolates of *Pythium irregulare*. Mycological Research 105: 85-93.
9. Kageyama, K., Ohya, A., and Hyakumachi, M. (1997). Detection of *Pythium ultimum* using polymerase chain reaction with species-specific primers. Plant Disease 81: 1155-1160.
10. Kageyama, K., Uchino, H., and Hyakumachi, M. (1998). Characterization of the hyphal swelling group of *Pythium*: DNA polymorphisms and cultural and morphological characteristics. Plant Disease 82: 218-222.
11. Levesque, C. A., and de Cock, A. W. A. M. (2004). Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. Mycological Research 108: 1363-1383.
12. Martin, F. (1995). Meiotic instability of *Pythium sylvaticum* as demonstrated by inheritance of the nuclear markers and karyotype analysis. Genetics 139: 1233-1246.
13. Matsumoto, C., Kageyama, K., Suga, H., and Hyakumachi, M. (2000). Intraspecific DNA polymorphisms of *Pythium irregulare*. Mycological Research 104: 1333-1341.
14. McLeod, A., Botha, W. J., Meitz, J. C., Spies, C. F. J., Tewoldemedhin, Y. T., and Mostert, L. (2009). Morphological and phylogenetic analyses of *Pythium* species in South Africa. Mycological Research 113: 933-951.
15. Plaats-Niterink, A. J. Van der (1981). Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn 21: 1-242.
16. Rafin, C., Brygoo, Y., and Tirilly, Y. (1995). Restriction analysis of amplified ribosomal DNA of *Pythium* spp. isolated from soilless culture systems. Mycological Research 99: 277-281.
17. Wang, P. H., and White, J. G. (1997). Molecular characterization of *Pythium* species based on RFLP analysis of the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. Physiological and Molecular Plant Pathology 51: 129-143.