نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، ص. ۲۳۰-۲۲۰

Journal of Plant Protection
Vol. 29, No. 2, Summer 2015, P. 220-230

بررسی تنوع ژنتیکی و رابطه فیلوژنتیکی جدایه‌های *Polymyxa betae* keskin در مزارع چغندرقند استان‌های خراسان رضوی و شمالی با استفاده از مکان‌های بین ژنی(ITS)

وحید جهانبخش[1*]- حمید روحانی[2]- ماهرخ فلاحتی رستگار[3]- بهروز جعفرپور[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۲۸

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و رابطه فیلوژنتیکی جدایه‌های *Polymyxa betae* از خاک ۴۹ مزرعه چغندرقند استان خراسان رضوی و شمالی نمونه‌برداری شد. سپس در خاک‌های جمع آوری شده بذر چغندر قند رقم IC کاشته شد و بعد از ۵ الی ۷ هفته، DNA کل ریشه چغندرقند استخراج شد و منطقه ۴۶۳ جفت بازی از قارچ *P.betae* شامل18s r RNA، ITS1، 5.8srRNA، ITS2 و 28s rRNA با استفاده از جفت آغازگرهای Pxfwd1/ITS4 تکثیر شدند. بیست و دو جدایه از گونه فوق انتخاب و توالی‌یابی گردیدند. توالی‌های به‌دست آمده با ۵ توالی از بانک ژن(NCBI) مقایسه شدند. بر طبق این آزمایش، جدایه‌های قارچ مزبور در دو گروه قرار گرفتند. جدایه‌های مناطق مختلف استان‌های خراسان رضوی و شمالی، در یک گروه و با شباهت ژنتیکی بسیار نزدیک به یکدیگر و جدایه‌های اروپایی در گروه جداگانه‌ای قرار گرفتند. نتایج این تحقیق حاکی از آن است که منطقه ITS2 نسبت به منطقه ITS1 در آنالیز فیلوژنی این جنس مناسب‌تر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استان خراسان رضوی، استان خراسان شمالی، آنالیز فیلوژنیک، تنوع ژنتیکی، *Poymyxa betae*

مقدمه

جنس *Polymyxa* تا قبل از دهه ۱۹۹۰ به عنوان یک قارچ متعلق به رده Plasmodiophoromycetes شناخته می‌شد ولی بعد از بررسی‌های مولکولی مشخص شد که فیلوژنی و منشاء این رده کاملاً با قارچها متفاوت است، به‌طوری‌که امروزه این جنس در سلسله Protozoa ، شاخه Plasmodiophoromycota، رده Plasmodiophoromycetes، راسته Plasmodiophorales و خانواده Plasmodiophroraceae قرار می‌گیرد و ارتباطی با سلسله قارچها ندارد (۷، ۱۷، ۱۹ و ۲۳). ابتدا جنس *Polymyxa* و به دنبال آن گونه *P.betae* شناسایی گردید (۱۱، ۱۲ و ۱۶). گونه *P.betae* انتشار جهانی داشته و حتی در مناطقی که سابقه کشت طولانی چغندرقند را نداشته اند وجود دارد (۳، ۶، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۳). در ایران گونه *P.betae* در سال ۱۳۷۵ برای اولین بار توسط ایزدپناه از استان فارس گزارش شده است (۱). این ناقل قادر است که بیماری‌های ویروسی متعدد و خطرناکی را به چغندر قند منتقل نماید که حداقل ۴ نوع از آن‌ها از استان‌های خراسان گزارش شده است که از مهم‌ترین آن‌ها بیماری ویروسی ریشه ریشی بوده و در حال حاضر به چغندرکاران خراسانی خسارت زیادی وارد می‌نماید وباعث کم شدن سطح زیر کشت این محصول مهم شده است (۲، ۳ و ۵).

با ابداع روش‌های نوین آزمایشگاهی، تحول شگرفی در تحقیقات بیولوژیک صورت گرفت. روش‌های زیست شناسی مولکولی به‌ویژه تعیین توالی اسید نوکلئیک به همراه آنالیزهای فیلوژنتیک برای مطالعات ژنتیکی بین جمعیت‌ها بسیار استفاده می‌گردد. این روش‌ها قادرند روابط بین افراد را مستقل از مورفولوژی آن‌ها و یا اختصاصی بودن میزبان، تخمین بزنند. در این میان مکان‌های بین ژنی the internal transcribed spacer(ITS) متعلق به rDNA از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند (۱۲، ۱۷، ۱۹، ۲۱ و ۲۲).

محققین نواحی ITS و 5.8 rDNA جدایه‌های *P.graminis* و *P.betae* را مطالعه و به اختلافات دو گونه فوق پی بردند، همچنین به این نتیجه رسیدند که plasmodiophorids یک گروه مجزا محسوب شده و ارتباط نزدیکی با سایر یوکاریوت‌ها، قارچها و پروتوزئوها ندارد. همچنین با مقایسه توالی‌های ژن 18SrDNA به ارتباط فیلوژنتیکی میان قارچها و شبه قارچها پی بردند (۲۲). محققین در بررسی دیگر نواحی از rDNA شامل ITS1، ITS2 و 5.8S r DNA متعلق به ۱۲ جدایه از دو گونه فوق که از هندوستان و غرب آفریقا جمع‌آوری شده بودند را بررسی نمودند. در این تحقیق ۴ ترادف

۱، ۲، ۳ و۴- به ترتیب دانشجوی سابق دکتری و استادان گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*-نویسنده مسئول: Email: vahid_jahan2003@yahoo.com)

مختلف از ۷ جدایه [سورگوم و Peanut clump (نوعی بادام زمینی)] به‌دست آمد که با ترادف‌های که قبلاً توسط سایر محققین برای جنس *Polymyxa* به‌دست آمده بود، تفاوت داشت که اختلافات به‌دست آمده مربوط به ترکیب و طول در نواحی ITS1 و ITS2 می‌باشد. همچنین ۵ فرم اختصاصی در میان جدایه‌های *P.graminis* پیشنهاد نمودند (۱۷). مطالعه تنوع ژنتیکی گونه *P.graminis* (جدا شده از ذرت، سورگوم، گندم، بادام زمینی و ارزن مرواریدی) در غرب قاره آفریقا در نواحی ITS1, 18S, 5.8S ITS2، تفاوت‌هایی را در میان ۲۴ جدایه گونه فوق نشان داد (۱۹ و ۲۰). محققان در طی تحقیقات مختلف بخش‌هایی از ژنوم جنس *Polymyxa* را شامل: 18S rRNA gene , ITS1 , 5.8S rRNA gene , ITS2 , 28S rRNA gene مطالعه نمودند و توانستند دو گونه *P.graminis* و *P.betae* را از یکدیگر جدا نمایند (۲۰).

به علت اهمیت زیاد *P.betae* در انتقال بیماری‌های مهم ویروسی هم‌چون ریشه ریشی چغندرقند و این‌که تا کنون مطالعات مناسبی بر روی تنوع ژنتیکی این ناقل در ایران و از جمله استان‌های خراسان رضوی و شمالی صورت نگرفته است، لذا این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و رابطه فیلوژنتیکی این ناقل مهم در دو استان فوق انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از مزارع چغندرقند

برای این منظور از مهم‌ترین مناطق چغندرقندکاری استان‌های خراسان رضوی و خراسان شمالی و از خاک مزارع نمونه‌برداری صورت گرفت. در مجموع از ۴۹ مزرعه متعلق به ۱۳ شهرستان نمونه‌برداری انجام شد.زمان نمونه‌برداری در خلال تیر و مرداد ماه سال ۱۳۸۹ بود. از هر مزرعه ۳ الی ۵ نمونه خاک (بسته به وسعت مزرعه) و حداقل هر یک به وزن یک کیلوگرم و ترجیحاً از اطراف ریشه چغندرقند و به طور تصادفی و در قسمت‌های مختلف هر مزرعه تهیه و در کیسه‌های نایلونی به طور مجزا به گلخانه منتقل شدند (جدول ۱).

بررسی‌های گلخانه‌ای

پس از انتقال نمونه‌های خاک به گلخانه، خاک‌های هر مزرعه به خوبی با هم مخلوط و در گلدان‌های پلاستیکی دو کیلویی ریخته شد و ۵ عدد بذر چغندرقند رقمIC (رقم مولتی ژرم و حساس به بیماری رایزمانیا) به عنوان گیاه تله در آن‌ها کاشته شد. برای هر نمونه خاک ۳ گلدان در نظر گرفته شد. تعدادی گلدان نیز به عنوان شاهد با خاک سترون و بذر ضدعفونی شده چغندرقند رقم IC (با هیپو کلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۱/۵ دقیقه) تهیه و در گلدان کاشته شدند. گلدان‌ها در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی مشهد و تحت شرایط دمای روزانه ۲۷ سانتی‌گراد و شبانه ۲۰ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی و با آبیاری روزانه نگهداری شدند. پس از گذشت ۵ الی ۷ هفته از کاشت بذور، ریشه گیاهان به کمک بیلچه سترون از خاک خارج و خاک‌های باقیمانده سطح ریشه به آرامی توسط آب جاری شسته شدند، سپس ریشه‌های مویین جدا و به روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱- مناطق نمونه‌برداری شده از خاک مزارع چغندرقند شهرستان‌های استان‌های خراسان رضوی و شمالی

نام شهرستان	نام منطقه	نام شهرستان	منطقه
مشهد	رضویه، چلاقی، میامی (مشهد) و قازخان	تربت جام	کارخانه قند تربت جام و ابدال آباد
سرخس	سرخس و جنگل	خواف	خواف و سلامی
نیشابور	سرولایت ، ملخ دره، ده سرخ و همت آباد (۲ مزرعه)	چناران	نهرآباد، چناران، نصرآباد، شغل آباد ،رادکان ، خرم آباد و گلمکان
سبزوار	خوشاب ، سلطان آباد (۲ مزرعه) و دشت جوین (۲ مزرعه)	قوچان و شیروان	فتح آباد ، قوچان و زیارت
تربت حیدریه	کدکن ، عبد آباد ، جلگه رخ، حشمت آباد، جوادیه ، دربان رضوی ، زاوه و تربت حیدریه	اسفراین	عباس آباد و سورک
فریمان	تقی آباد، قلندرآباد،کته شمشیر، مرغزار و سفید سنگ	بجنورد	عسگرآباد ، باغان، اسحاق آباد و بجنورد

شکل ۱- ناحیه تکثیر شده توسط دو آغازگر Pxfwd1 وITS4 در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

ردیابی مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی *P.betae*

بدین منظور، ابتدا DNAی گیاه چغندر قند از ریشه‌های مویین آن استخراج گردید. برای این کار از کیت استخراج DNA (Accuprep ® GMO-Bioneer – کره جنوبی) استفاده شد .درجه خلوص DNAی استخراج شده با استفاده از دستگاه Nano drop 2000 (Thermo scientific) برحسب نانوگرم بر میکرولیتر اندازه‌گیری شد. سپس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و به کمک دو آغازگر اختصاصی ناحیه‌ای به طول ۴۸۰ جفت باز شامل :

18S rRNA gene (partial) , ITS1 , 5.8S rRNA gene , ITS2 , 28S rRNA gene (partial)

تکثیر شد. توالی دو آغازگر بکار رفته در این آزمایش به شرح زیر است (۲۰) (شکل ۱) :

Pxfwd1= 5´- CTGCGGAAGGATCATTAGCGTT -3' ITS4= 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'

مواد اضافه شده به کیت آماده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل: DNAی استخراج شده از ریشه چغندرقند (۷۵ نانو گرم بر میکرولیتر)، هر یک از آغازگرهای فوق (۲ میکرولیتر و به غلظت µM ۵) و تا حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر، آب مقطر سترون استفاده شد. بهینه‌سازی مواد با استفاده از دستگاه Masyercycler gradient (Eppendorf AG –Germany) صورت گرفت. برنامه حرارتی، شامل دمای واسرشت سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود و در دستگاه ترموسایکلر (Biometra,Tpersonal، آمریکا) انجام گردید. محصول نهایی PCR در ژل اگارز ۱/۲ درصد تحت ولتاژ ثابت ۸۰ به مدت ۹۰ دقیقه در حضور نشانگر DNA 100 جفت بازی (Fermentas) الکتروفورز گردید. برای هر چاهک دو میکرولیتر محصول در نظر گرفته شد.جهت رنگ آمیزی از رنگ آماده DNA green viewer با غلظت یک میکرولیتر در هر ۱۰ میلی‌لیتر ژل آگارز استفاده گردید. سپس نتایج با دستگاه UK ترانس لومیناتور مشاهده شد، وجود و یا عدم وجود قطعه تکثیر شده به صورت تک باند در محدوده ۴۸۰ جفت بازی مورد بررسی قرار گرفت. تمامی مراحل فوق برای شاهد (چغندرقند سالم) انجام گردید (شکل ۲).

بررسی تنوع ژنتیکی *P.betae* بر اساس بخشی از نواحی rDNA، توالی‌یابی بخشی از ژنوم *P.betae* انجام گردید. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز متعلق به نواحی مختلف استان‌های خراسان رضوی و خراسان شمالی انتخاب و به کشور کره جنوبی ارسال شدند. توالی‌یابی به روش توالی‌یابی مستقیم صورت گرفت. پس از انجام آنالیزهای مختلف، تنوع ژنتیکی و آنالیز فیلوژنتیکی جدایه‌های به‌دست آمده با برنامه MEGA 5.10 مورد استفاده قرار گرفتند.

تجزیه تحلیل نتایج حاصل از توالی یابی

توالی‌های به دست آمده توسط نرم افزار BioEdit بررسی گردید (۴ و ۱۵). بعد از اطمینان از صحت توالی‌های به دست آمده از دو رشته توالی‌یابی شدهٔ مستقیم و معکوس توسط نرم فزار DNA Baser رشتهٔ واحدی (از'5 به '3) مرتب شد. توالی‌های حاصله با جدایه‌های ثبت شده در NCBI مقایسه شدند. هر توالی به طور جداگانه توسط نرم افزار Blast n در بانک ژن جستجو شد و توالی‌های حاصل از Blast توسط نرم افزار Clustal W هم ردیف شدند (۱۹). در این مطالعه علاوه بر جدایه‌های ایرانی، از ۴ جدایه ثبت شده *P.betae* در بانک ژن شامل دو جدایه از انگلستان (با شماره دسترسی FN3939761 و EU244489.1)، یک جدایه از بلژیک (AJ31181) و یک جدایه از ترکیه (AJ311582) انتخاب شد .همچنین یک جدایه از گونه *P.graminis* (FN393973.1) به عنوان گروه خارجی استفاده شد (شکل های ۳ ،۵، ۶ و ۷).

آنالیز فیلوژنتیکی

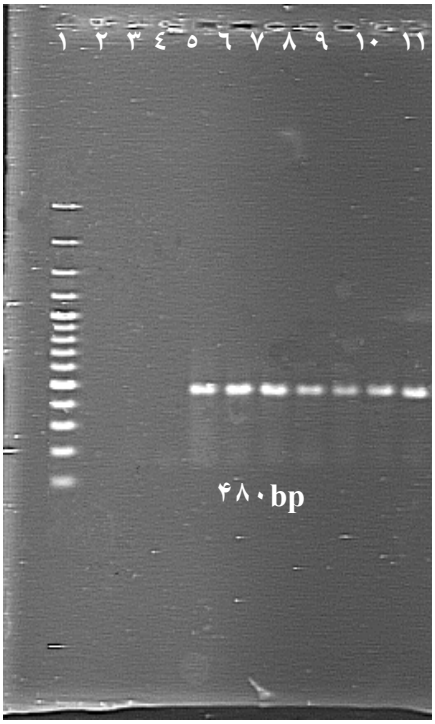
پس از همردیف نمودن توالی‌ها توسط نرم افزار Clustal W، با استفاده از برنامه‌های MEGA 5.10 درخت‌های فیلوژنتیکی ترسیم شدند. Bootstrap بر پایه ۱۰۰۰ تکرار جهت انجام برنامه MEGA 5.10 انتخاب گردید. درخت‌های تهیه شده با استفاده از روش الحاق همسایه(Neighbor Joining) در برنامه MEGA 5.10 ترسیم گردید. همچنین از برنامه MEGA 5.10 برای تعیین فواصل نوکلئوتیدی و مقایسه نوکلئوتیدهای ایرانی با اروپایی استفاده شد.۲۲ جدایه در این بررسی شرکت داده شدند.

به منظور ترسیم هیستوگرام مربوط به نمایش نمودار فواصل درون گونه‌ای پس از تعیین فواصل نوکلوتیدی به دست آمده با استفاده از نرم افزار Excel، نمودار مربوطه رسم شد (شکل ۴).

نتایج

ردیابی مولکولی و تنوع ژنتیکی *P.betae*

پس از استخراج DNAی چغندرقند، غلظت آن تا ۱۳۰ ng/µl تعیین شد. از مجموع ۴۹ نمونه DNAی مورد بررسی در ۴۰ نمونه در ناحیه یاد شده تکثیر شد و باندی در محدوده۴۸۰ جفت بازی ایجاد کردند (شکل ۲).



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR در ژل افقی آگارز ۱/۲ درصد رنگ آمیزی شده با DNA green viewer. ستون ۱ نشانگر DNA (۱۰۰bp DNA Ladder)، ستون۲: کنترل منفی (آب مقطر سترون)، ستون ۳: عدم تشکیل باند اختصاصی *P.betae* در DNA ی ریشه چغندرقند سالم، ستون ٤: عدم تشکیل باند اختصاصی در DNA ی ریشه چغندرقند غیر آلوده به *P. betae*، ستون‌های 5 الی 11: باند480 جفت باز تکثیر شده در ۷ جدایه *P.betae* .

نتایج آزمایش نشان داد که جدایه‌های ایرانی (خراسانی) نسبت به یکدیگر در ناحیه مورد بررسی دارای ۹۷ تا ۹۹ درصد شباهت بودند و همچنین از ۹۶ تا ۱۰۰ درصد شباهت نسبت به جدایه‌های اروپایی ثبت شده در بانک ژن برخوردار بودند.

ارتباط فیلوژنتیکی

درخت حاصل از برنامه MEGA 5.10، شامل دو گروه جداگانه از یکدیگر شامل جدایه‌های ایرانی و جدایه‌های اروپایی می‌باشند. جدایه‌های ایرانی در یک گروه بزرگ (و در زیر گروه‌های کو چک‌تر) در درخت پراکنده بوده، در صورتی‌که تمامی جدایه‌های اروپایی با ضریب Bootstrap ۶۵ در یک گروه قرار دارند. همچنین جدایه‌های هر منطقه جغرافیایی در گروه‌های کوچک‌تر در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. بیشترین ضریب Bootstrap را جدایه‌های (زاوه، جلگه رخ و کدکن) و (دشت جوین، خوشاب وسلطان آباد) به ترتیب با ۹۹ و ۹۸ دارند. طول کم شاخه‌ها حاکی از شباهت آن‌ها نسبت به یکدیگر بود هر چند که جدایه‌های هر زیر شاخه با توجه به ناحیه جغرافیایی شان در شاخه خاص قرار گرفتند ولی در شاخه‌ای که در آن جدایه‌های (سفید سنگ ، تربت جام وخواف) وجود دارد، وجود جدایه سرولایت نیشابور (با علامت * در شکل ۳) که متعلق به ناحیه جغرافیایی دیگری است، غیر معمول به نظر می‌رسد. فاصله درون گونه‌ای *P.betae* در استان‌های خراسان از صفر تا ۰/۰۴ درصد است و فاصله بین جمعیت *P.betae* در استان‌های خراسان با جدایه‌های *P.betae* از اروپا بین صفر تا ۰/۲۰ درصد و فاصله بین جمعیت جدایه‌های *P.betae* از خراسان با *P.graminis* بین ۰/۲۱ درصد تا ۰/۲۲ درصد متغیر است. گونه *P.graminis* به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد و خارج از دو گروه فوق در درخت فیلوژنی قرار گرفت.

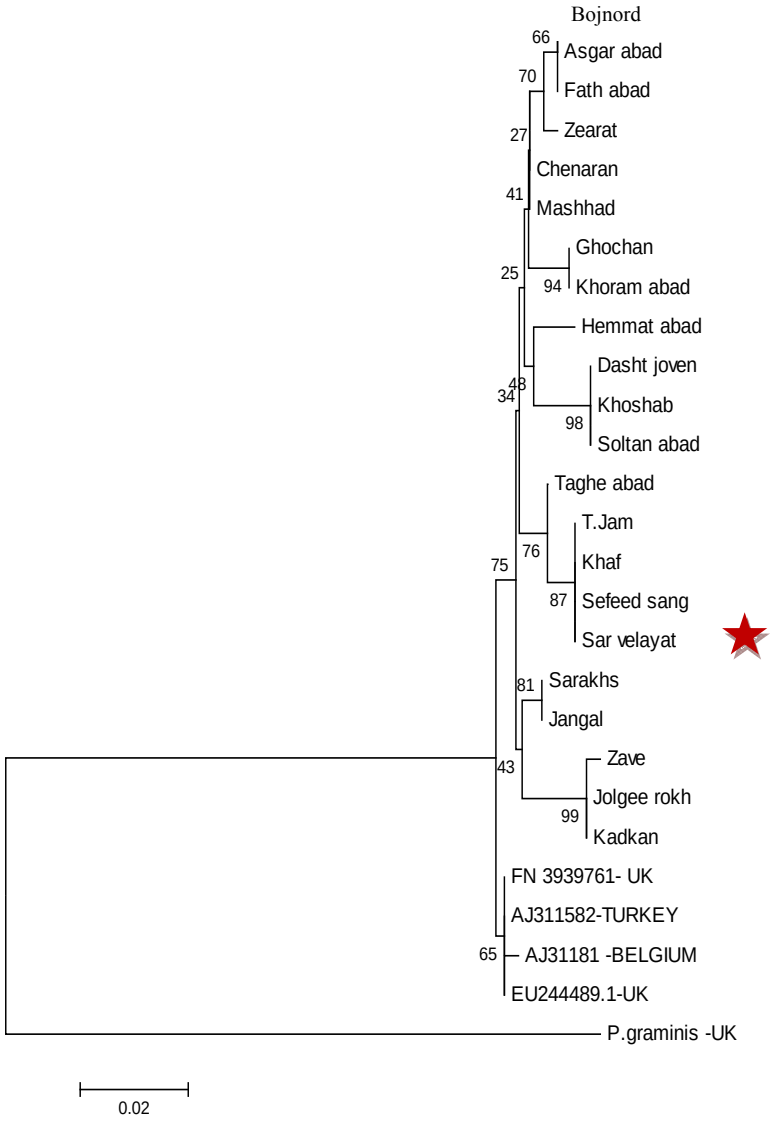
آنالیز مکان بین ژنی ITS 1

درخت فیلوژنی حاصل از توالی یابی مکان بین ژنی ITS1 نشان داد که جدایه‌های ایرانی در یک گروه با Bootstrap، ۶۲ در کنار یکدیگر قرار گرفتند و جدایه‌های اروپایی با Bootstrap ،۴۳ در یک شاخه دیده می‌شدند. فاصله درون گونه‌ای جمعیت *P.betae* استان خراسان از صفر تا ۰/۲۰ درصد بود و فاصله بین جمعیت *P.betae* در استان خراسان با جدایه‌های *P.betae* اروپایی بین صفر تا ۰/۲۰ درصد بود که این مطلب نیز در طول کم و فشرده شاخه ها نسبت به هم دیده می‌شود. فاصله جمعیت جدایه‌های *P.betae* خراسان با *P.graminis* بین ۰/۶۴ درصد تا ۰/۶۷ درصد تعیین شد. گونه *P.graminis* به عنوان گروه خارجی (Outgroup) در نظر گرفته شد و خارج از دو گروه فوق در درخت فیلوژنی قرار گرفت. ناحیه ITS1 دارای ۱۱۴ جفت باز بوده و حاوی تنها یک SNP در نوکلئوتید شماره ۵۷ بود. مطالعه بر روی جایگاه بین ژنی ITS1 نشان داد در بین جدایه‌های ایرانی (خراسانی) در این جایگاه تنوع زیادی وجود نداشته و این جایگاه بین ژنی نتوانست جدایه‌های ایرانی را از یکدیگر متمایز نماید، که این موضوع را می‌توان در اندازه کوتاه شاخه‌های ایجاد شده درخت فیلوژنتیک نیز مشاهده نمود. طول کم شاخه‌های ایجاد شده نشانگر شباهت زیاد جدایه‌های ایرانی نسبت به یکدیگر بود (شکل ۵).

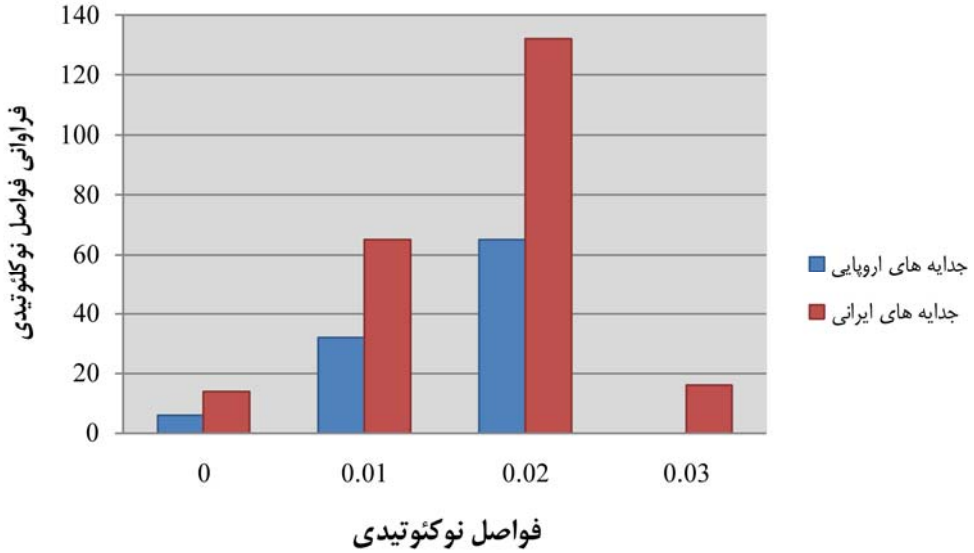
آنالیز ژن 5.8S rRNA

پس از رسم درخت فیلوژنتیکی حاصل از توالی ژن 5.8SrRNA مشخص شد که جدایه‌های کدکن، زاوه، همت آباد نیشابور و جلگه رخ با ضریب Bootstrap ۹۷ بیشترین شباهت را نسبت به یکدیگر از خود نشان دادند. فاصله درون گونه‌ای جدایه‌های *P.betae* در استان‌های خراسان در این ژن از صفر تا ۰/۰۴ درصد و فاصله بین جمعیت *P.betae* در استان‌های خراسان در این ژن از صفر تا ۰/۰۴

درصد و فاصله بین جمعیت *P.betae* در استان‌های خراسان با جدایه‌های *P.betae* از اروپا بین ۰/۰۱ درصد تا ۰/۰۴ درصد بود. همچنین فاصله جمعیت جدایه‌های *P.betae* خراسان با جدایه *P.graminis* بین ۰/۰۴ درصد تا۰/۰۸ درصد محاسبه شد. این ژن دارای ۱۴۶ جفت باز، حاوی پنج SNP بود که بر این اساس ژن فوق توانست جدایه‌های خراسانی *P.betae* را نسبت به مکان بین ژنی ITS1 بهتر تفکیک نماید. نوکلئوتید های متفاوت در هر جایگاه مشخص شده‌اند. همچنین طول شاخه‌های ایجاد شده منتهی به جدایه‌های ایرانی و پراکندگی آن‌ها در شاخه های متعدد نشانگر تنوع بیشتر جدایه‌های ایرانی نسبت به یکدیگر (تنوع درون گونه‌ای بیشتر) و طول کم شاخه‌های منتهی به جدایه های ایرانی با جدایه‌های اروپایی *P.betae* (در سمت چپ درخت) نشانگر تنوع ژنتیکی کم در بین این دو گروه بود. محل جدایه‌های اروپایی مانند جایگاه آن‌ها در سایر درختان رسم شده، به صورت گروه جداگانه‌ای دیده می‌شد. گونه *P.graminis* به عنوان گروه خارجی، خارج از سایر گروه‌ها قرارگرفت (شکل ۶ و جدول ۲).



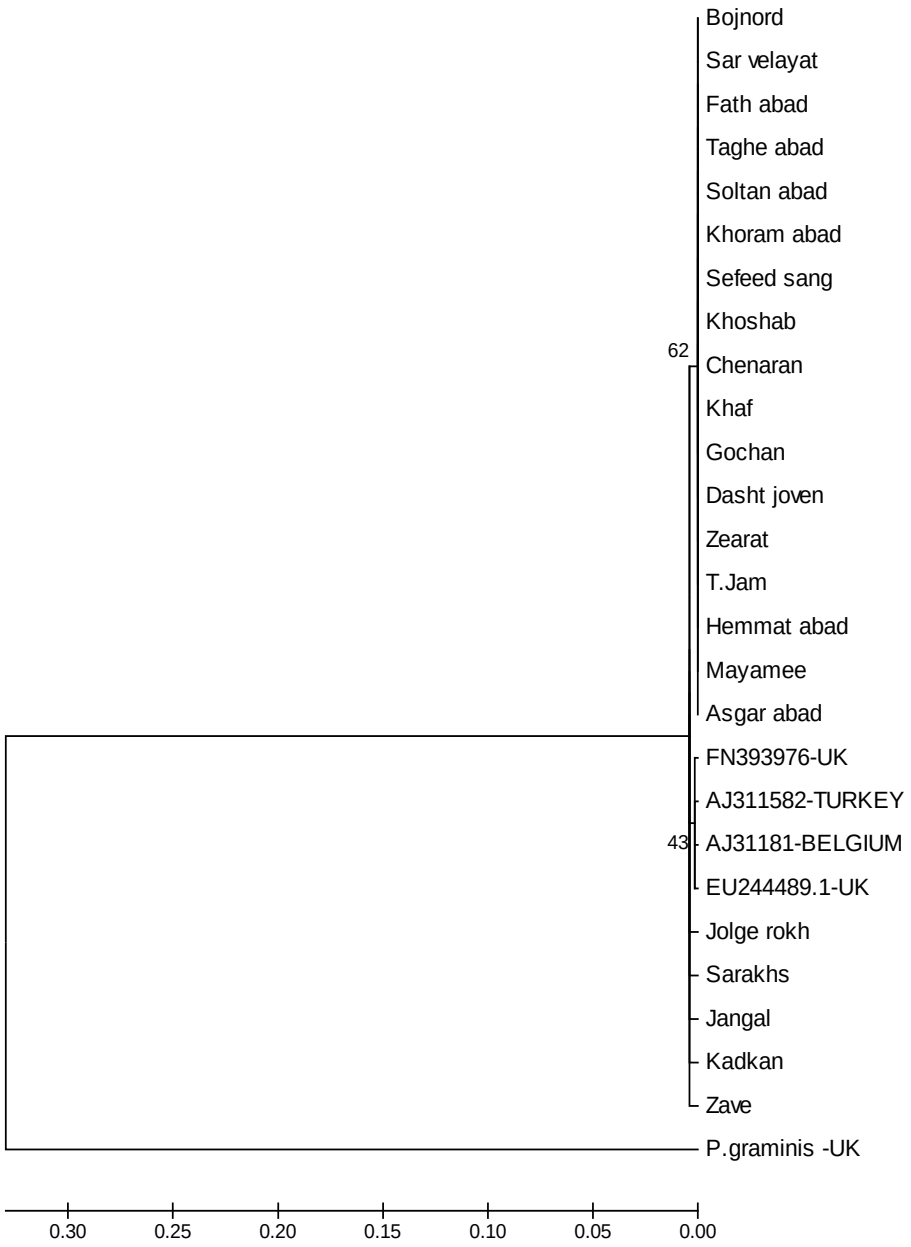
شکل ۳ – درخت فیلوژنتیک حاصل از توالی‌یابی گونه *P.betae* متعلق به جدایه‌های ایرانی (خراسانی) و اروپایی. این درخت به روش NJ و به کمک نرم افزار MEGA 5.10 ترسیم شد .اعداد روی هر گروه نشان دهنده ضریب Bootstrapping می‌باشد. ضریب Bootstarp بر پایه ۱۰۰۰ تکرار انجام شد.



شکل ٤- نمایش هیستوگرا م توزیع فواصل نوکلئوتیدی درون گونه‌ای *P.betae* در جدایه‌های ایرانی (خراسانی) و جدایه‌های اروپایی

جدول۲- موقعیت SNP های *P.betae* در جدایه‌های خراسانی در توالی ژن 5.8S rDNA.

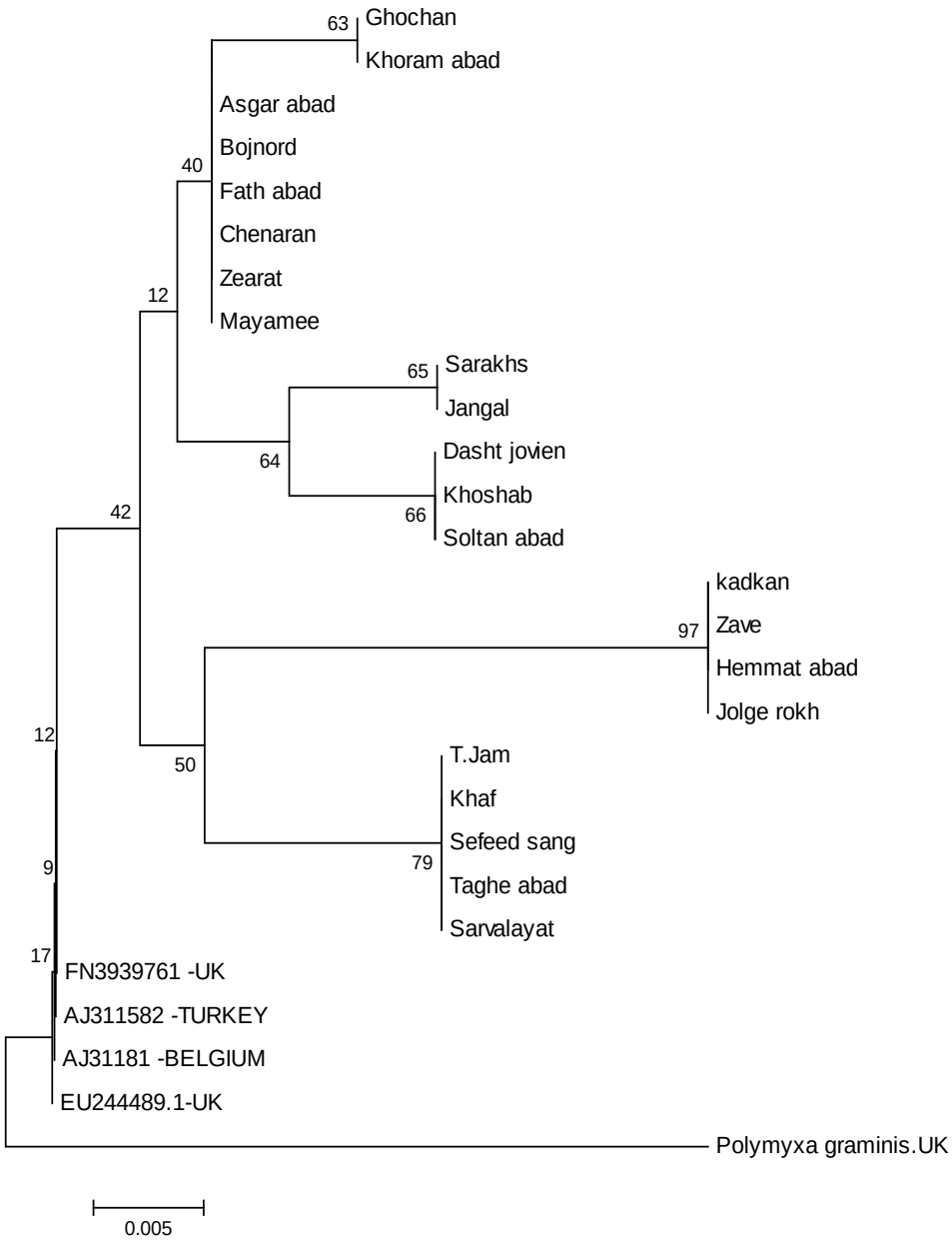
	SNP				
جدایه	٦	٧٥	١٠٥	١٣٢	١٤٢
Mayamee	C	G	T	*G*	C
Jolge rokh	C	*C*	T	*G*	C
Hammet abad	C	*C*	T	C	C
Sarakhs	C	G	*C*	C	C
T.jam	*T*	G	T	C	C
Zearat	C	G	T	C	C
Dasht jovien	C	G	T	C	*G*
Nahr abad	C	G	T	C	C
Jangal	C	G	C	C	C
Abdal abad	C	G	T	C	C
Nasr abad	C	G	T	C	C
Kadkan	C	G	T	*G*	C
Khoshab	C	G	T	C	*G*
Sefeed sang	C	G	T	C	C
Khoram abad	C	G	T	C	C
Zave	C	*C*	T	C	C
Soltan abad	C	G	T	C	C
Taqe abad	C	G	T	*G*	C
Fath abad	C	G	T	C	C
Bojnord	C	G	T	C	C
Sar velayat	C	G	T	C	C
Asgar abad	C	G	T	C	C



شکل ۵- درخت فیلوژنتیک حاصل ازتوالی‌یابی منطقه ITS1 جدایه‌های ایرانی (خراسانی) و اروپایی گونه *P.betae* .این درخت به روش NJ و به کمک نرم افزار MEGA 5.10 ترسیم شد. اعداد روی هر گروه نشان دهنده ضریب Bootstrapping می‌باشد.Bootstrap بر پایه ۱۰۰۰ تکرار انجام شد.

آنالیز مکان بین ژنی ITS 2

درخت فیلوژنتیک رسم شده این مکان بین ژنی مشخص نمود که بیشترین شباهت متعلق به جدایه‌های کدکن، همت آباد، جلگه رخ و زاوه با Bootstrap ۹۷ و کمترین شباهت در بین جدایه‌های اصغر آباد، بجنورد، فتح آباد، چناران، زیارت و میامی با Bootstrap ۴۰ بود. فاصله درون گونه‌ای *P.betae* در جدایه‌های استان خراسان بین صفر تا ۰/۰۴ درصد و فاصله بین جمعیت *P.betae* خراسان با جدایه‌های *P.betae* از اروپا بین صفر تا ۰/۳۰ درصد بود. همچنین فاصله جمعیت جدایه‌های *P.betae* ایرانی با *P.graminis* بین ۰/۳۲ تا ۰/۳۵ درصد محاسبه شد. در این مکان بین ژنی نیز تفاوت چشمگیری در بین جدایه‌ها مشاهده نمی‌شد و طول کم شاخه‌ها بیانگر این موضوع می‌باشد(شکل ۷).این ژن دارای ۱۳۶ جفت باز است و در جدایه‌های مورد بررسی ده SNP (در جایگاه‌های، ۱۱،۲۵،۳۸،۴۳،۶۵،۶۶،۷۴،۱۰۹،۱۲۳،۱۳۲) مشاهده شد.



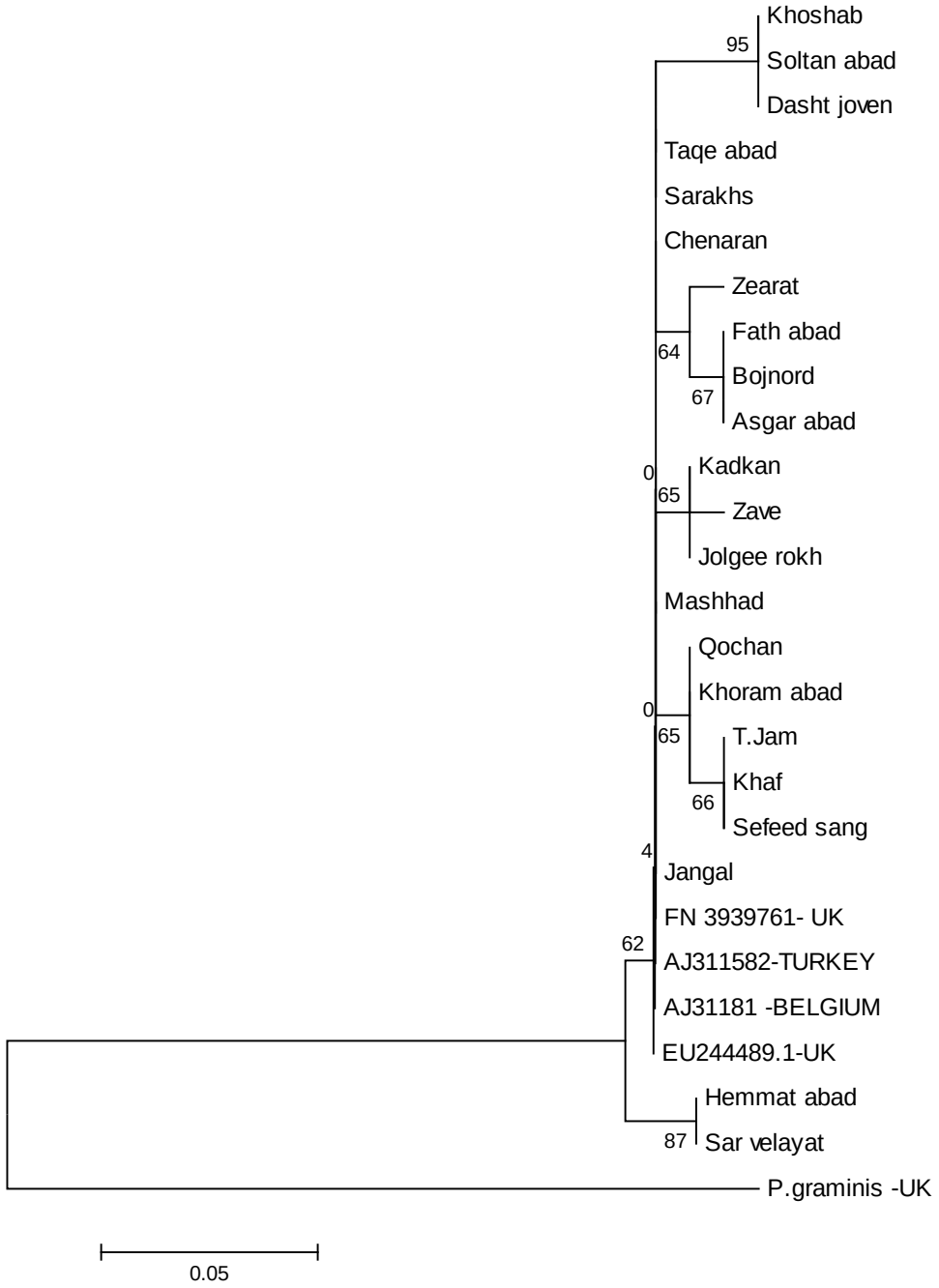
شکل ٦- درخت فیلوژنتیک حاصل ازتوالی‌یابی ژن 5.8SrRNA جدایه‌های ایرانی (خراسانی) و اروپایی گونه *P.betae* . این درخت به روش NJ و به کمک نرم افزار MEGA 5.10 ترسیم شد. اعداد روی هر گروه نشان دهنده ضریب Bootstrapping می‌باشد .Bootstrap بر پایه ۱۰۰۰ تکرار انجام شد.

بحث

جنس *Polymyxa* تا قبل از دهه ۱۹۹۰ به عنوان یک قارچ متعلق به رده Plasmodiophoromycetes ، شناخته می‌شد ولی بعد از بررسی‌های مولکولی مشخص گردید که فیلوژنی و منشاء این رده کاملاً با قارچ‌ها متفاوت است، به‌طوری‌که امروزه جنس *Polymyxa* در سلسله Protozoa قرار می‌گیرد و ارتباطی با سلسله قارچ‌ها ندارند (۲۲).

P.betae قادر است توسط روش‌های گوناگونی در مزارع چغندرقند و در مناطق دور دست پراکنده شود. خاک آلوده، آب آبیاری آلوده، استفاده از آب زهکشی آلوده برای آبیاری، عبور ماشین آلات کشاورزی در زمین‌های آلوده، حرکت دام در مزارع آلوده و همچنین خاک باقیمانده در کامیون‌های حمل کننده چغندرقند، این ناقل را قادر ساخته است به راحتی از مزارع آلوده به مزارع سالم و در مناطق مختلف استان‌های خراسان منتقل گردد. سیستوسورهای مقاوم این

ناقل دارای دیواره ضخیمی هستند و قادرند ویروس‌هایی مانند BNYVV را در مواد دفعی دام‌هایی که از بقایای چغندرقند تغذیه می‌کنند، زنده نگهدارند (۸ و ۲۳) به نظر می‌رسد انتشار وسیع بیماری در ناحیه کارخانجات قند به علت استفاده از خاک اضافی حاصل از فراوری کارخانه‌ها رخ می‌دهد (۱۴). موضوع مهم دیگر این است که، کشاورزان هنگام کاشت چغندرقند می‌توانند پیمان کشت خود را با کارخانجات قند مناطق دیگر (که کشاورزان را حمایت بیشتری می‌نمایند) منعقد نموده، و محصول خود را به کارخانه قند مورد نظر تحویل نمایند، لذا این عوامل روش‌های آسان و گوناگون پراکنش *P.betae* را در سطح وسیع بهتر آشکار می‌نماید، درنتیجه می‌توان گفت یکی از دلایل عمده در وجود شباهت ژنومی زیاد در ۲۲ جدایه مورد مطالعه به علت وجود شرایط فوق دانست. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق با مطالعات سایر محققان مطابقت داشت (۲۲ و ۲۳).



شکل ۷- درخت فیلوژنتیک حاصل ازتوالی‌یابی منطقه ITS2 جدایه‌های ایرانی (خراسانی) و اروپایی گونه *P.betae*. این درخت به روش NJ و به کمک نرم افزار MEGA 5.10 ترسیم شد. اعداد روی هر گروه نشان دهنده ضریب Bootstrapping می‌باشد. Bootstrap بر پایه ۱۰۰۰ تکرار شد.

مطالعات فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه‌های ایرانی در شاخه‌ای متمایز از سایر جدایه‌های کشورهای اروپایی قرار گرفته‌اند و این گروه‌بندی در تمامی نواحی بین ژنی (ITS1,ITS2) و ژن 5.8S rDNA صدق می‌کند. گروه‌بندی به‌دست آمده احتمالاً بیانگر موقعیت جغرافیایی در ارتباط با نوع هر یک از جدایه‌هاست. به عبارت دیگر جدایه‌های یک منطقه جغرافیایی خاص و نواحی اطراف آن از تنوع ژنتیکی و جایگاه فیلوزنتیکی خاص خود برخودار بودند. این مطلب در مورد جدایه‌های اروپایی نیز صدق می‌کند، به‌طوری‌که این جدایه‌ها دریک شاخه مجزا و در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. گونه *P.graminis* در تمامی درخت‌های فیلوژنتیک به عنوان گروه خارجی قرار گرفت .فقط یک مورد خاص در ارتباط با جدایه سر ولایت نیشابور دیده می‌شود، که این جدایه در شاخه "تربت جام، خواف و سفید سنگ" قرار گرفته است که احتمال دارد این جایگاه به علت انتقال جدایه‌های *P.betae* در منطقه سر ولایت نیشابور از طریق روش‌های یاد شده در بخش های قبلی به منطقه فوق باشد (شکل ۳).

فاصله درون گونه‌ای جدایه‌های *P.betae* در استان خراسان‌های رضوی و شمالی از صفر تا ۰/۰۴ درصد بود و فاصله بین جمعیت *P.betae* در این نواحی با جدایه‌های *P.betae* از اروپا بین صفر تا ۰/۲۰ درصد تعیین شد و همچنین دارای همپوشانی بالایی با جدایه اروپایی ثبت شده در بانک ژن دارا بودند، که در نتیجه به نظر می‌رسید در میان جدایه‌های ایرانی (خراسانی) *P.betae* از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار نیستند و درنتیجه در درخت فیلوژنتیک، در یک شاخه (و در زیر شاخه‌هایی با طول‌های کم) قرار گرفته‌اند، ولی تفاوت نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی *P.betae* با *P.graminis* بیشتر بود و گونه *P.graminis* در یک شاخه جداگانه به صورت گروه خارجی در درخت فیلوژنتیک قرار گرفت.

منابع

۱-ایزدپناه ک.، هاشمی پ.، کامران ر.، پاک نیت م.، سهند پور آ. و معصومی م. ۱۳۷۵. وجود گستره بیماری ریشه ریشی (شبه رایزومانیا) در فارس. مجله بیماری شناسی گیاهی ۳۲ : ۲۰۶-۲۰۰.

۲-جعفرپور ب. ۱۳۷۹. بررسی و تعیین پراکنش ویروس، موزاییک چغندر قند و ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر قند در شمال خراسان و شناسایی ویروس خاکزاد چغندر در ایران.پایان نامه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی. دانشگاه فردوسی. ۱۳۲ صفحه.

۳-کامران ر.، ایزدپناه ک. و شیروانی ع. ۱۳۷۹. بررسی پراکنش *Polymyxa betae* ناقل ویروس ریشه گنایی چغندرقند در فارس. خلاصه مقالات چهارمین کنگره گیاه پزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان.جلد دوم،صفحه ۸۴.

۴-نقوی م.ر.، ملبویی م ع. و رشیدی منفرد س. ۱۳۸۸. بیوانفورماتیک (داده‌پردازی زیستی). انتشارات دانشگاه تهران.۱۴۷ صفحه.

۵-بی نام. سالنامه آماری کشوری. ۱۳۸۸. سازمان برنامه و بودجه. مرکز آمار ایران.

6- Abe H., and Tamada T. 1986. Association of Beet necrotic yellow vein virus with isolates of *polymyxa betae* Keskin. Annual Review of Phytopathology Japan, 52 :232-247.

7- Adams M.J., and Ward E. 1997. Molecular studies of the plasmodiophorids .Plant Pathology and Microbiology Department, Rothamsted Research. Available http://www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/ppi/links/pplinks/plasmod/index.html.

8- Alexopolus C.J., Mims C.W., and Blackwell M.1996.Introduction mycology.John Wiley and Sions,INC.868 PP.

9- Asher M.J.C., and Dewar A.1999.Rhizomania and other pestes and diseases in 1998. British sugar beet rev, 67:13-15.

10- Asher M.J.C. 1999.Sugar-beet rhizomania:The spread of a soilborne disease. Microbiology Today.26:121-123.

11- Binder M., and Hibbett D. 2003. Hibbett Lab protocols for DNA isolation,PCR, and sequencing. www.clarku.edu/faculty/dhibbett/Protocols_Folder/Lab_protocols.pdf. Visited: 2010/09/08.

12- Braselton J.P.1988. Karyology and systematics of Plasmodiophoromycetes .pp:1139-1520.In Development in Applied Biology 2, Viruses with fungi vector.(J.I. Cooper and M.J.C. Asher, eds.) Uneversity of Andrews, UK.

13- Canova A. 1966. Si studia la rizomania della bietola. Inf. Fitopatology. 10: 235-239 .

14- Cook D A.,and Scott R K.1993. The Sugar Beet Crop: Science into Practice. Chapman and Hall, World Crop Series. 675 pp.

15-Hall T.A.1999.A user friendly biological sequence alignment edit and analysis program for windows 95/98/NT.Nucleic Acids Spmpser, 41:95-98.

16- Keskin B., and Fuchs W.H. 1969. Der Infektionsvorgang bei *Polmyxa betae* .Arch.Mikrobiol.68:218-226.

17-Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., and Higgins D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23:2947-2948.

18- Legreve A., Delfosse P., Van hese., Bragard C., and Maraite H . 2002. Broad-spectrum detection of *Polymyxa* species and from species by polymerase chain reaction. P. 40-43. In C M. Rush and U. Merz(ed.) Proceedings of the fifth Symposium of international working group plant viruses with fungal vectors **.** Institute of Plant Sciences, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zurich, Switzerland.

19- Legreve A., Delfosse P., Ribonnet L., Paridaens A.M., Lurkin R., and Maraite H. 2005. Diversity of *Polymyxa graminis* associated with cereals in West Africa. Parasitica, 61: 5-10**.**

20- Legreve A., Delfosse P., Vanpee B., Goffin A., and H**.** Maraite .1998. Differences in temperature requirements between *Polymyxa* sp. of Indian origin and *Polymyxa graminis* and *Polymyxa betae* from temperate areas., European Journal of Plant Pathology, 104**:** 195–205.

21- Ward E., Adams M.J., Mutasa E.S., Collier C.R., and Asher M.J.C.1994. Characterization of *Polymyxa* species by restriction analysis of PCR-amplified ribosomal DNA. Plant Pathology, 43:872-877.

22- Ward E., and Adams M.J. 1998. Analysis of ribosomal dna sequences of *Polymyxa* species and related fungi and the development of genus-and species-specific PCR primers.Mycological Research,102(8): 965-974.

23- Webster J., and Webe R.W.S. 2007. Introduction of Fungi. Third Edition. 841pp.