

## تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *Paecilomyces formosus* Sakag. عامل بیماری سرخشیدگی درختان پسته در استان‌های خراسان رضوی و یزد

فاطمه رستمی<sup>۱</sup>، سید کاظم صباغ<sup>۲\*</sup>، ناصر پنجه‌که<sup>۳</sup> و مهدی پیرنیا<sup>۴</sup>

۱، ۳ و ۴. دانشجوی دکتری، دانشیار و استادیار، بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۲. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه یزد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۱۶)

### چکیده

در این بررسی تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی جدایه‌های *Paecilomyces formosus* sakag. عامل بیماری سرخشیدگی درختان پسته در استان‌های یزد و خراسان رضوی بررسی شد. بررسی تنوع ژنتیکی ۵۰ جدایه منتخب با استفاده از نشانگر SSR، درجه بالایی از چندشکلی را در جدایه‌های مختلف نشان داد. با استفاده از تجزیه خوشه‌ای بر مبنای ضریب الگوریتم UPGMA و ضریب همانندی جاکاردا، جدایه‌ها با سطح تشابه ۷۵ درصد در ۱۱ گروه قرار گرفتند. شاخص شانون، تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCoA) و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد، بیشترین میزان تغییر ژنتیکی (۸۱ درصد) درون جدایه‌ها توزیع شده و تنوع ژنتیکی بین جدایه، ۱۹ درصد است. در بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر PVar15 مناسب‌ترین آغازگر برای تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌ها تشخیص داده شد. بیشترین تنوع را در جدایه‌ها نشان داد. بررسی آزمون بیماری‌زایی و مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد، جدایه‌های مهریز و ابرکوه در استان یزد به ترتیب بیشترین و کمترین توان بیماری‌زایی را دارند. نتایج همچنین نشان می‌دهد، بین جدایه‌های هر استان رابطه اختصاصی وجود دارد ولی بین جدایه‌های دو استان و تنوع ژنتیکی آن‌ها هیچ رابطه‌ای مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تجزیه واریانس مولکولی، توالی ساده تکراری، چندشکلی.

## Genetic diversity and pathogenicity among *Paecilomyces formosus* isolates the causal agent of pistachio dieback in Khorasan Razavi and Yazd provinces

Fatemeh Rostami<sup>1</sup>, Seyed Kazem Sabbagh<sup>2\*</sup>, Naser Panjehkeh<sup>3</sup> and Mehdi Pirnia<sup>4</sup>

1, 3, 4. Ph. D. Student, Associate Professor and Assistance Professor, Department of Plant Protection, University of Zabol, Iran

2. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Iran

(Received: Aug. 6, 2016 - Accepted: May 6, 2017)

### ABSTRACT

In this research, genetic diversity and pathogenicity of *Paecilomyces formosus* isolates, causal agent of die-back disease of pistachio trees in Yazd and Khorasan Razavi provinces were investigated. Genetic diversity of 50 selected isolates using SSR markers, showed a high degree of polymorphism between isolates. Cluster analysis based on UPGMA algorithm and Jaccard's similarity coefficient, divided the isolates into 11 groups with 75% similarity level. Shannon index, Principal coordinates analysis (PCoA) and analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that the highest genetic variation (81%) was disturbed among isolates and genetic variation within isolates was determined as 19%. Between used primers, PVar15 was more appropriate than others to study of genetic diversity of isolates. Study of pathogenicity test and mean comparison mean of data showed that isolates of Mehriz and Abarkoh regions in Yazd province had the most and lowest aggressive isolates, respectively. Our results indicated that there is a specific relationship between the isolates of each region whereas no relationship was identified between related isolates belongs to two provinces and their genetic diversity.

**Keywords:** Analysis of molecular variance, cluster analysis, polymorphism, single sequence repeat.

\* Corresponding author E-mail: sksabbagh@yazd.ac.ir

### مقدمه

گونه‌های جنس *Paecilomyces* به صورت پوده‌رست (ساپروفیت) و انگل (پارازیت) روی میزبان‌های مختلفی قادر به زندگی بوده و از سراسر جهان گزارش شده‌اند (Groll & Walsh, 2001; Pastor & Guarro 2006). شماری از این گونه‌ها مانند *P. fumosoroseus*، بیمارگر حشرات بوده و شماری نیز مانند *P. lilacenus* به‌عنوان بیمارگر (پاتوژن) انسان و *P. formosus* نیز از نمونه‌برداری‌های انجام‌شده از بیماری‌های انسان، از نواحی مختلف جهان گزارش شده‌اند (Abbas et al., 2009; Barker et al., 2014). گونه *P. variotii* مرکب بوده که شامل گونه‌های *P. variotii sensu stricto* (teleomorph, *Byssochlamys spectabilis*)، *P. dactylethromorphus*، *P. formosus*، *P. brunneolus* و *P. divaricatus* است (Houbraken et al., 2010; Samson et al., 2009). شناسایی قارچ‌ها بر پایه ویژگی‌های ظاهری و شرایط رشدی یکی از کهن‌ترین روش‌های تشخیص قارچ‌ها به شمار می‌آید. این روش برای قارچ‌هایی مانند گونه‌های کمپلکس *Fusarium graminearum* و *P. variotii* که همانندی‌های زیستی زیاد دارند بسیار دشوار و وقت‌گیر بوده و همواره می‌تواند نتایج تشخیصی را دچار مشکل کند (Barker et al., 2014). استفاده از روش‌های مولکولی بر پایه DNA ژنگانی (ژنومی) با به‌کارگیری نشانگرهایی مانند SSR راه را برای رسیدن به نتایج بهتر و واقعی‌تر در شناسایی قارچ‌ها هموار کرده است.

بیماری سرخشکیدگی درختان پسته که به وسیله عامل غالب از جنس *Paecilomyces* ایجاد می‌شود یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این درخت است که در چند سال اخیر با پیشرفتی سریع باعث خشک شدن کامل درختان از سرشاخه به سوی تنه شده است (Mozaffari et al., 2005). این گونه به‌عنوان عامل اصلی بیماری، نخستین بار در استان کرمان مشاهده شد (Aminaei, 1985). نتایج تحقیقات Alizadeh et al. (1999) نشان داد، سه گونه قارچ، به ترتیب کاهش فراوانی در منطقه رفسنجان شامل *Paecilomyces Natrassia mangifera* و *Cytospora sp. variotii*

قادر به ایجاد سرخشکیدگی در درختان پسته هستند. در بررسی دیگری که توسط Ghelichi et al. (2014) در استان خراسان رضوی صورت گرفت گونه‌های *P. Stemphylium spp.* و *N. mangiferae, variotii* فراوانی‌های مختلف گزارش شدند که قادر به ایجاد بیماری روی درختان پسته هستند. در تحقیقات جدید، عامل این بیماری در گونه *Paecilomyces formosus* قرار گرفته است (Heidarian et al., 2015). با توجه به وجود اطلاعات اندک در مورد ساختار ژنتیکی این بیمارگر، نیاز به تعیین تنوع ژنتیکی آن به کمک نشانگر قوی احساس می‌شود. میزان تغییرپذیری در (توالی) ریز ماهواره‌ها به‌طور چشمگیری، بیش از دیگر قسمت‌های ژنگان است. منبع تغییرپذیری در نشانگر توالی‌های ساده تکراری (SSRs) می‌تواند مرتبط به لغزش (خطای) DNA پلیمرز در فرآیند افزایش DNA و شکست در تصحیح اتصال‌های اشتباه (mismatches)، باشد (Karaoglu et al., 2005). در تحقیقی برای بررسی تنوع ژنتیکی گونه *P. fumosoroseus* با استفاده از نشانگر RAPD و بررسی توالی‌های ناحیه ITS، جدایه‌های مورد ارزیابی به پنج گروه تفکیک شدند که از لحاظ ریخت‌شناختی نیز قابل جداسازی بودند (Azevedo et al., 2000a). بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. fumosoroseus* به‌دست‌آمده از حشرات و نواحی جغرافیایی مختلف با استفاده از هضم آنزیمی ناحیه rDNA-ITS نشان داد، جدایه‌های بررسی‌شده در سه گروه مجزا جداسازی می‌شوند (Fargues et al., 2002). در بررسی مولکولی با استفاده از تغییر طول تلومری ناشی از آنزیم‌های با تأثیر محدود (Telomeric restriction length polymorphism)، برای گونه‌های *P. fumosoroseus* و *P. lilacenus*، جدایه‌ها به‌درستی به گونه‌های اختصاصی‌شان جداسازی شدند، اما ارتباط زیادی بین گروه‌های انگشت‌نگاری DNA با دامنه میزبانی و منشأ جغرافیایی جدایه‌ها یافت نشد (Inglis & Tigano, 2005). برای بررسی چندشکلی درون‌گونه‌ای قارچ *P. lilacenus* با استفاده از نشانگر (مارکر) RAPD نیز بین جدایه‌ها از نظر ژنتیکی تفاوت فراوانی وجود داشت، اما ارتباطی بین گروه‌های انگشت‌نگاری DNA حاصل با

زیرپوست به تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA (Potato Dextrosz Agar, Difco) منتقل و در گرمخانه در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از رشد قارچ، از حاشیه هر پرگنه یک دیسک به محیط کشت آب-آگار (WA) برای خالص‌سازی منتقل شد. عمل خالص‌سازی با روش نوک ریشه و تک اسپوری انجام شد. با تهیه لام میکروسکوپی از هر جدایه، شناسایی دقیق هر کدام از جدایه‌ها با استفاده از منابع معتبر (Brown & Smith, 2000; Hoog et al., 1974; Samson, 1957) و با توجه به ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی انجام گرفت. ویژگی‌های ماکروسکوپی شامل حضور شکل جنسی و رنگ پرگنه و ویژگی‌های میکروسکوپی شامل طول یاخته کنیدی‌زا، نحوه انشعاب‌ها و اندازه کنیدیوفور، اندازه فیالید، اندازه و شکل کنیدی‌هاست.

#### بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر SSR

##### استخراج DNA

استخراج DNA به روش CTAB انجام گرفت. DNA در دمای  $20$ - درجه سلسیوس نگهداری شد. تعیین کیفیت و کمیت DNA به کمک روش‌های الکتروفورز با عبور دادن از ژل آگارز ۱ درصد و با استفاده از دستگاه الکتروفورز (Bio-RAD, USA) و دستگاه نورسنج زیستی (بیوفتومتر) CICELE مدل ۲۰۲۱ صورت گرفت. برای عکس‌برداری، ژل به دستگاه ژل خوان (Bio-RAD, USA) منتقل شده و عکس‌برداری انجام گرفت.

##### طراحی آغازگر

به‌منظور طراحی آغازگر ریزماهواره از توالی ژنگان *Byssochlamys spectabilis* No.5 از NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/BAUL00000000](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/BAUL00000000)) استفاده شد. پس از تعیین توالی ریزماهواره‌ها، با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) (Rozen & Skaletsky, 2000)، آغازگرها بر پایه نواحی کناری ریزماهواره‌ها طراحی شدند. درنهایت، از مجموع ده آغازگر استفاده‌شده، پنج آغازگر که افزونش مناسب

پراکنش جغرافیایی مشاهده نشد (Yanna et al., 2006a). با بررسی ۲۸ جدایه *P. variotii* در استان کرمان به کمک نشانگر PCR-RFLP، جدایه‌ها با سطح همانندی ۷۰ درصد در نه گروه قرار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد با توجه به اینکه جدایه‌های هر منطقه در دودمان همسانه (کلونی) همان منطقه قرار گرفتند، بین جدایه‌های هر منطقه رابطه اختصاصی وجود دارد ولی بین پراکنش و تنوع جدایه‌های قارچی و دوری و نزدیکی مناطق جغرافیایی مختلف استان کرمان از هم هیچ رابطه‌ای مشاهده نشد (Ebrahimi et al., 2015). در ارتباط با بیماری‌زایی جدایه‌های *P. variotii* اطلاعات کمی در دسترس است. بیماری‌زایی جدایه‌های جدا شده از باغ‌های استان کرمان مقایسه شده که از نظر شدت بیماری‌زایی اختلاف معنی‌داری بین جدایه‌های مناطق مختلف مشاهده شده است (Ebrahimi, 2012). با توجه به گسترش روزافزون این بیماری، کنترل آن اهمیت بسزایی دارد. استفاده از رقم‌های مقاوم، به‌عنوان روش‌های کنترلی ایمن و سازگار با محیط‌زیست اهمیت بالایی دارد. برای رسیدن به این مهم، شناسایی جمعیت بیمارگر در سطح گونه امری ضروری است. از سوی دیگر، تنوع ژنتیکی می‌تواند باعث افزایش مقاومت قارچ به قارچ‌کش‌ها شود. هدف از این پژوهش، تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. formosus* گردآوری‌شده از استان‌های یزد و خراسان رضوی به کمک نشانگر توالی‌های ساده تکراری و مقایسه میزان بیماری‌زایی آن‌ها بود.

##### مواد و روش‌ها

##### نمونه‌برداری، جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی جدایه‌های قارچی

نمونه‌برداری در سال‌های ۹۳-۹۱ به‌طور تصادفی از باغ‌های پسته استان‌های یزد و خراسان رضوی صورت گرفت، به‌طوری‌که درختان با نشانه‌های خاص همانند خشکیدگی شاخه‌ها، شانکر و گموز در شاخه و تنه‌های اصلی بازدید و به‌صورت تصادفی شماری شاخه آلوده انتخاب و به میزان ۱۰-۱۵ سانتی‌متر جدا و به آزمایشگاه منتقل شد. پس از ضدعفونی سطحی شاخه‌ها با الکل ۷۵ درجه، قطعه‌های کوچکی از نواحی

درجهٔ سلسیوس به مدت یک دقیقه، ۴۸-۵۵ درجهٔ سلسیوس به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت یک دقیقه به ترتیب برای واسرشت‌سازی، اتصال و بسط (DNA) در نظر گرفته شد. محصول ناشی از واکنش PCR از ژل آگارز ۲ درصد در دستگاه الکتروفورز (Bio-Rad, USA) با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه عبور داده شد. سپس نوارهای به‌دست‌آمده توسط دستگاه ژل‌خوان عکس‌برداری و ثبت شد. برای تأیید اندازهٔ قطعه‌های به‌دست‌آمده، از نرم‌افزار TotalLab (TL120 v2008) استفاده شد.

قطعات را داشتند برای بررسی‌های تعیین تنوع ژنتیکی استفاده شدند (جدول ۱).

#### واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

افزودن قطعه‌های DNA با واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر (شامل ۱۲/۵ میکرولیتر PCR master (سینا ژن)، ۱۰ میکرولیتر آب دیونیزهٔ استریل، ۱ میکرولیتر DNA الگو (۲۰ نانوگرم) و ۱ میکرولیتر آغازگر) در دستگاه ترموسایکلر مدل Eppendorf انجام گرفت. شمار ۳۵ چرخهٔ (سیکل) گرمایی (۹۵

جدول ۱. ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Paecilomyces formosus* با استفاده از نشانگر SSR

Table 1. Characters of primers used in the study of genetic diversity of *P. formosus* isolates by SSR marker

Locus	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Motif	Expected size	N° Alleles	Tm
PVar11	CACATAGCAAGGCCACATCC	GATGGTGTGACTGCCTCG	(TG)13	295	5	52
PVar12	ATGCACTTGGAGTTGGAGGAC	ATGTCTTTGAGGAGGCGAGAG	(TC)11	254	6	50
PVar13	ACTGGGTGATGATGATGACG	GCCACGGTAGAACAGAAGG	(CT)14	158	4	53
PVar14	GTGGGCAAATGATACGCTCG	CATGTGCTGACGGTGGAAAC	(GA)12	297	3	50
PVar15	ACCTGTATTCACCTGGACCG	TGCTGAGAGACTGTGTGAGG	(CAA)11	226	2	52
PrBtB07	GGAGATATGTGGAGAGTTGA	CATTATAGCAGCGAACCA	(GT)15	-	3	54
PrBtD05	GGCAAGTCACCAGATACGTC	GGATATGATGAAAGCCCTC	(CA)12	-	2	49
PrBtB04	GTTGGTGCCTGTGAGAG	ATGTAAGGCGATTGGCAG	(GT)15	-	5	49
PrBtD11b	GAGTGTGCTGTGCCAGTG	GCTATGTGCTGTGCTAGAT	(GT)16	-	5	50
PrBtD11a	F GCGAATCTCGTCTTCAAC	CACTGGCACACGACACTC	(GAGT)7	-	2	48

صورت گرفت و نمودار شجره‌ای (دندروگرام) مربوط به آن‌ها که نشانگر میزان همانندی و یا فاصلهٔ ژنتیکی جدایه‌های مورد استفاده در آزمون بود، ترسیم شد.

#### بررسی شدت بیماری‌زایی در گلخانه

برای هر کدام از جدایه‌های *P. formosus* سه نهال سالم دو سالهٔ پستهٔ رقم اوحدی (رقم حساس) در گلدان‌های پلاستیکی (۱۵-۳۵ سانتی‌متری) استفاده شد. به‌عنوان تیمار شاهد، روی دو نهال قسمتی از پوست برداشته و میزانی از پرگنه از قارچ تازه رشد کرده در شرایط سترون زیرپوست قرار داده شد و آنگاه با نوار پارافیلیم پوشانده شد. از پلاستیک‌های بزرگ برای ایجاد شرایط رطوبتی مناسب برای رشد اولیهٔ قارچ به مدت ۷۲ ساعت استفاده و سپس نهال‌های آلوده‌شده به گلخانه منتقل شدند. روش Afek *et al.* (1990) با کمی تغییر صورت گرفت. گلدان‌ها در گلخانه با شرایط ۲۰ تا ۳۰

#### تجزیه و تحلیل داده‌ها

##### تجزیهٔ داده‌ها

به‌منظور تعیین تنوع ژنتیکی، از نرم‌افزار PopGene32 (Yeh *et al.*, 1999) استفاده شد و نوارهای قابل‌رویت روی ژل آگارز بر پایهٔ وجود (یک) یا نبود (صفر) نوار رتبه‌بندی شدند. تجزیهٔ واریانس مولکولی نیز به کمک نرم‌افزار GenAlEx 6.5b3 انجام گرفت (Peakall and Smouse, 2012).

##### تجزیهٔ خوشه‌ای

تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های مربوط به انگشت‌نگاری DNA با استفاده از نرم‌افزار NTSYS pc version 2.10 (Rohlf, 1998) انجام شد. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌ها با استفاده از الگوریتم Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) و ضریب همانندی جاکارد

ماهواره‌ای متفاوت بود اغلب ژنگاه‌ها تنوع ژنی داشتند و میانگین تنوع ژنی بین ۱۰ ژنگاه ۳۴ درصد محاسبه شد. آغازگرهای PVar15 و PVar14 به ترتیب بیشترین (۴۸ درصد) و کمترین (۲۶ درصد) تنوع ژنی را داشتند (جدول ۲).

**بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های *P. formosus***  
با استفاده از نرم‌افزار پاپ ژن، تنوع ژنی (h) بر پایه ضریب Nei برای یازده جمعیت این قارچ از یازده منطقه جغرافیایی مختلف استان‌های یزد و خراسان رضوی محاسبه شد و سهم هر منطقه در تنوع این گونه قارچی در استان کرمان بررسی شد. بیشترین شمار آلل‌های مشاهده شده با میزان ۱/۱۴ در جمعیت منطقه صدوق و کمترین آن در جمعیت منطقه عشق‌آباد ۱/۰۵۱ دیده شد. جمعیت‌های صدوق و عشق‌آباد به ترتیب بیشترین و کمترین تنوع ژنی را داشتند (جدول ۳). بر پایه تجزیه PCoA داده‌ها با استفاده از ماتریس همانندی جاکارد در نرم‌افزار NTSYS از بین ۵۰ مؤلفه به دست آمده، پنج مؤلفه مقادیر ویژه بزرگ‌تر از یک داشتند و ۵۲/۴۷ درصد تنوع موجود را توجیه کردند. میانگین *Gst* درون جمعیت‌ها برابر با ۰/۸۳ برآورد شد و این نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های موجود در سطح بالا وجود دارد.

درجه سلسیوس قرار داده و هر ۲-۳ روز یکبار گلدان‌ها آبیاری می‌شدند. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی اجرا شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش دانکن با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام شد.

## نتایج و بحث

### جداسازی و شناسایی جدایه‌ها قارچی

در این بررسی در مجموع شمار ۲۱۴ جدایه از گونه *P. formosus* متعلق به مناطق مختلف استان‌های یزد و خراسان رضوی جداسازی شد. که از این شمار ۵۰ جدایه بر پایه پراکنش جغرافیایی و تنوع در ویژگی‌های ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) برای بررسی‌های مولکولی انتخاب شدند.

### توزیع فراوانی آلل‌ها و بررسی چندشکلی نوارهای ناشی از نشانگر ریزماهواره

در مجموع ۳۶ آلل برای ده ژنگاه (لوکوس) ریزماهواره‌ای در بین ۵۰ جدایه مورد آزمایش شناسایی شد. شمار آلل‌ها در بین ۱۰ لوکوس ۶-۲ آلل محاسبه شد. نتایج آزمون اونز-واترسون نشان داد همه ژنگاه‌های بررسی شده در این تحقیق خنثی بوده ( $P \leq 0.05$ ) و توزیع آلی مشاهده شده برای آن‌ها تحت تأثیر انتخاب و فشار انتخابی قرار نگرفته است (داده‌ها نشان داده نشدند). تنوع ژنی بین ۱۰ ژنگاه ریز

جدول ۲. شاخص‌های تنوع ژنتیکی ۱۰ ژنگاه SSR شناسایی شده برای ۵۰ جدایه *P. formosus*

Table 2. Genetic diversity indexes of five SSR loci identified for 50 isolates of *P. formosus*

Locus	Observed heterozygosity	Effective alleles No.	Gene diversity	Shannon index	Gst	Nm
PfrBtB04	0.295	1.487	0.297	0.460	0.773	0.296
PfrBtD11b	0.275	1.439	0.270	0.412	0.837	0.837
PfrBtB07	0.444	1.820	0.442	0.632	0.823	0.109
PfrBtD11a	0.359	1.645	0.374	0.556	0.819	0.142
PfrBtD05	0.341	1.523	0.343	0.527	0.872	0.073
PVar11	0.270	1.444	0.276	0.432	0.583	0.701
PVar12	0.391	1.772	0.401	0.562	0.947	0.031
PVar13	0.407	1.785	0.415	0.596	0.830	0.137
PVar14	0.261	1.449	0.264	0.415	0.555	0.498
PVar15	0.467	1.937	0.484	0.677	0.969	0.016
mean	0.341	1.614	0.346	0.511	0.839	0.096
St. Dev		0.358	0.162	0.206		

جدول ۳. شاخص‌های تنوع ژنتیکی برای یازده جمعیت ایرانی *P. formosus*

Table 3. Genetic diversity indexes from 11 Iranian population *P. formosus*

Population	No. isolate	Private Allele	Effective alleles number	Gene diversity	Shannon index
Feyz abad (kh*)	5	1	1.052	0.031	0.047
Neyshabor (kh)	5	0	1.077	0.044	0.065
Eshgh Abad (kh)	5	0	1.0513	0.027	0.037
Sabzevar (kh)	5	0	1.065	0.04	0.06
Ardakan (Ya)	4	0	1.117	0.063	0.089
Mehriz (Ya)	4	1	1.122	0.07	0.101
Sadoogh (Ya)	5	0	1.142	0.084	0.126
Taft (Ya)	4	0	1.09	0.056	0.082
Tabas (Ya)	5	0	1.12	0.071	0.107
Abarkooh (Ya)	5	0	1.130	0.08	0.12
Bahadoran (Ya)	3	0	1.06	0.037	0.05

\* Kh=Khorasan ; Ya=Yazd

جدول ۴. تجزیه واریانس مولکولی جدایه‌های *P. formosus*

Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) of *P. formosus* isolates

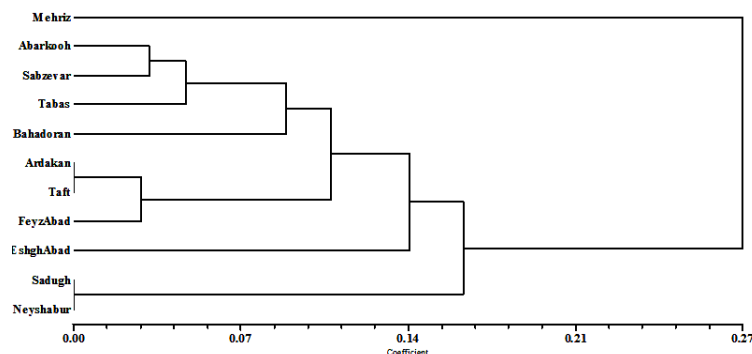
Source	Degrees of freedom	Sum Squares	Mean Squares	Variance	%	PhiPT
Among Pops	10	261.91	26.19	5.5	81%	0.08
Within Pops	49	49.5	1.269	1.269	19%	
Total	59	311.14		6.763	100	

مقادیر  $G_{ST}$  و  $N_m$  همخوانی دارد و تمایز بین جمعیت‌های مناطق جغرافیایی مختلف را توجیه می‌کند.

#### همانندی ژنتیکی جمعیت‌های *P. formosus*

همانندی ژنتیکی بدون اریب نی برای هر جفت از جمعیت‌ها بین ۰/۳۴ تا ۱ به دست آمد. بیشترین همانندی ژنتیکی بین جمعیت‌های عشق‌آباد و نیشابور (۰/۹۲) مشاهده شد و بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های عشق‌آباد و ابرکوه (۰/۳۴) به دست آمد. نتایج مشاهده شده با فاصله جغرافیایی بین مناطق یادشده و میزان جریان ژنی محاسبه شده بین جمعیت‌ها همخوانی دارد. نمودار شجره‌ای فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها با استفاده الگوریتم UPGMA نیز مؤید نتایج به دست آمده بود (شکل ۱).

بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های *P. formosus* تجزیه واریانس مولکولی با استفاده از آزمون AMOVA و به کمک نرم‌افزار GenALEX version 6.5b3 نشان می‌دهند که تنوع درون جمعیت‌ها ۱۹ درصد از سهم کل تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها را شامل می‌شود، درحالی‌که میزان قابل توجهی از تنوع ژنتیکی که ۸۱ درصد برآورد شد، بین جمعیت‌های مناطق جغرافیایی مختلف مشاهده شد که نشان‌دهنده جدا بودن جمعیت‌ها از هم است (جدول ۴). در این تحقیق میانگین جریان ژنی بین جمعیت‌ها ۰/۱ برآورد شد که نشان‌دهنده تمایز بین جمعیت‌ها است. همچنین مثبت بودن این میزان جریان ژنی خود نیز تأییدی بر انتقال مواد ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف این گونه است. نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس مولکولی با نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌ها و



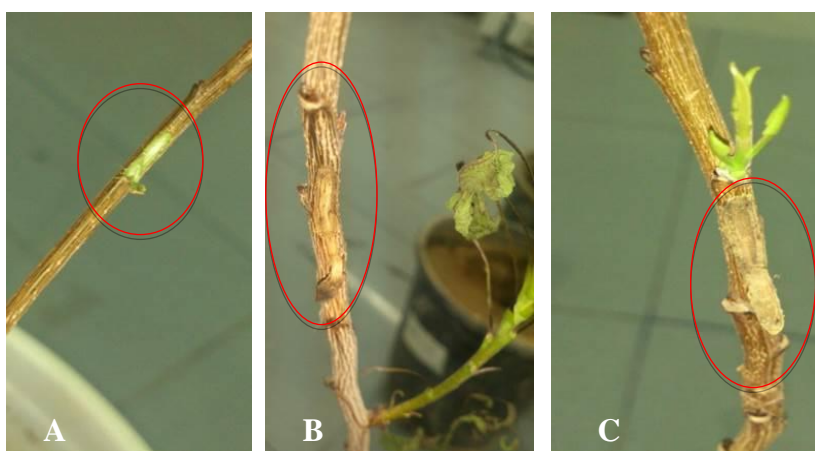
شکل ۱. نمودار شجره‌ای فاصله جمعیت‌های *P. formosus* بر پایه بیماری‌زایی با استفاده از الگوریتم UPGMA  
Figure 1. Cluster analysis of distance between populations of *P. formosus* based on pathogenicity data by UPGMA

ژنتیکی گونه‌های دیگر این جنس قارچی با استفاده از نشانگرهای مختلف همخوانی ندارد، که دلیل آن می‌تواند تفاوت گونه قارچی یا تفاوت در نشانگر ژنتیکی مورد استفاده در بررسی تنوع باشد (Azevedo *et al.*, 2000b; Cantone & Vandenberg, 1998; Fargues *et al.*, 2002; Inglis & Tigano, 2006; Tigano-Milani *et al.*, 1995; Yanna *et al.*, 2006b).

#### مقایسه بیماری‌زایی

بر پایه نتایج تجزیه واریانس داده‌های به‌دست‌آمده از آزمون بیماری‌زایی با استفاده از جدایه‌های منتخب هر منطقه (جدول ۵)، مشخص شد که همه جدایه‌ها روی نهال پسته در شرایط آزمایشگاه بیماری‌زا بودند. نشانه‌ها در آغاز به‌صورت لکه‌های سیاه‌رنگ در سطح پوست شاخه‌های آلوده ظاهر شد که به‌تدریج توسعه‌یافته که به دلیل اختلاف رنگ از قسمت‌های سالم شاخه به‌آسانی شناخته می‌شوند (شکل ۲).

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه خوشه‌ای جدایه‌ها نشان داد، جدایه‌های درون یک دودمان همسانه متعلق به یک منطقه جغرافیایی هستند که این نتیجه با نتایج که در یک تحقیق روی جداسازی و تشخیص ژنگاه‌های ریزماهواره (میکروستایلت) گونه *P. fumosoroseus* با نه نشانگر ریزماهواره انجام و مشخص شد که اختلاف این جدایه‌ها بنا بر محل جغرافی‌شان بود، همخوانی دارد (Dalleau-Clouet *et al.*, 2005). در بررسی دیگری که با استفاده از نشانگر PCR-RFLP روی نمونه‌های *P. formosus* در استان کرمان صورت گرفت نتایج نشان داد، با توجه به اینکه جدایه‌های هر منطقه در دودمان همسانه همان منطقه قرار گرفتند، بین جدایه‌های هر منطقه رابطه اختصاصی وجود دارد ولی بین پراکنش و تنوع جدایه‌های قارچی و فاصله‌های مناطق جغرافیایی مختلف استان کرمان هیچ رابطه‌ای مشاهده نشد (Ebrahimi *et al.*, 2015). البته باید عنوان کرد نتایج این تحقیق با شماری از بررسی‌های مربوط به بررسی تنوع



شکل ۲. مقایسه بیماری‌زایی دو جدایه *P. variotii* (B و C) در مقایسه با شاهد (A)

Figure 2. Comparison of virulence of two *P. variotii* isolates (B and C) compared with the control (A)

جدول ۵. تجزیه واریانس (ANOVA) شدت بیماری مربوط

به ۵۰ جدایه *P. formosus*

Table 5. Analysis of variation (ANOVA) of disease severity for 50 isolates of *P. formosus*

Source of changes	df	Sum square	Mean Square	F Value
Treatment	61	62.14	1.018	13.85**
Error	118	8.68	0.073	
Total	179	70.82		

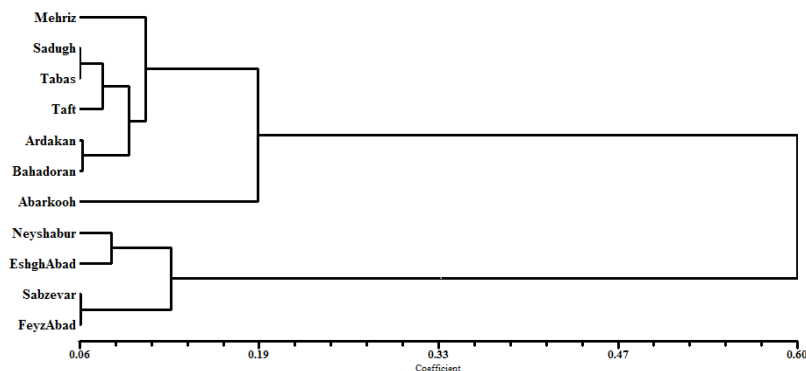
\*\* اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

\*\* Significantly different at 1% probability level.

بر پایه نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه میانگین بر پایه روش دانکن، اختلاف معنی‌داری بین جدایه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد و جدایه YCH2 (مهریز) بیشترین میزان آلودگی روی شاخه‌های رقم اوحدی را نشان داد (به طول ۴/۲ سانتی‌متر) اما جدایه YAB3 (ابركوه) کمترین میزان آلودگی را سبب شد (به طول ۲/۲ سانتی‌متر).

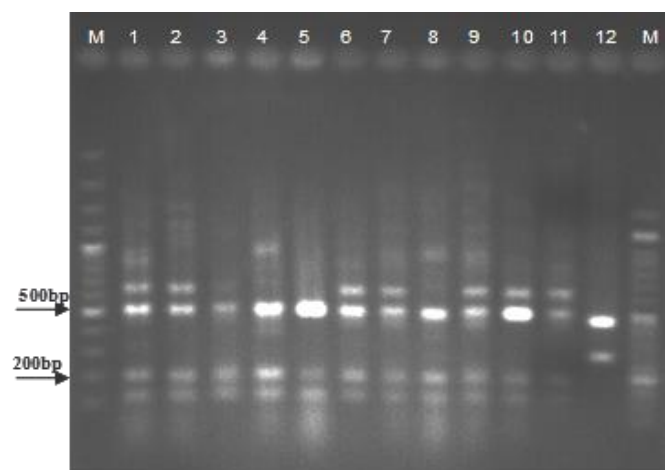
بیماری‌زایی وجود دارد (شکل ۳) و نتایج به‌دست‌آمده از گروه‌بندی بیماری‌زایی، گروه‌بندی مولکولی را تأیید نمی‌کند.

نتایج مقایسه گروه‌بندی مولکولی و بیماری‌زایی جدایه‌های *P. formosus* نشان داد که ارتباط وضعی از نظر آماری بین تنوع مولکولی و شدت



شکل ۳. نمودار شجره‌ای فاصله ژنتیکی جمعیت‌های *P. formosus* با استفاده از فاصله ژنتیکی نی و الگوریتم UPGMA بر پایه تجزیه و تحلیل ۱۰ ژنگاه SSR

Figure 3. Cluster analysis of genetic distance between populations using Nei genetic distance by UPGMA based on the analysis of five loci



شکل ۴. قطعه‌های DNA افزون‌شده از ۱۲ جدایه منتخب قارچ *P. formosus* با آغازگر PVar12، ستون M: خط نشانگر مولکولی 100bp. ستون‌های ۱-۱۲ به ترتیب جدایه‌های طبس ۱، طبس ۲، نیشابور ۱، عشق‌آباد، نیشابور ۲، صدوق ۱، صدوق ۲، بهادران، مهریز ۱، مهریز ۲، سبزوار و فیض‌آباد.

Figure 4. Amplified DNA fragments from 12 selected isolates of *P. formosus* using PVar12 primer. M= DNA Ladder (100bp); 1-Tabas1; 2- Tabas2; 3- Neyshabour1; 4-Eshghabad; 5- Neyshabour2; 6- Sadough 1; 7- Sadough2; 8- Bahadoran; 9- Mehriz1; 10- Mehriz2; 11- Sabzevar; 12-Feyz abad, respectively.

است با توجه به گسترش روزافزون این بیماری در مناطق کشت پسته، بررسی‌های بیشتر مورد نیاز است زیرا بالا بودن تنوع در هر منطقه باعث افزایش توانایی عامل بیماریزا در رویارویی با تغییر شرایط محیطی و روش‌های کنترل می‌شود از سوی دیگر امکان شکستن مقاومت در رقم‌های مقاوم نیز وجود دارد.

#### نتیجه‌گیری کلی

با توجه به تنوع بیماری‌زایی و ژنتیکی جدایه‌های *P. formosus* در مناطق مورد بررسی، لزوم بررسی‌های بیشتر به‌منظور شناخت علل این تنوع لازم است که می‌تواند شامل چرخه‌های نوترکیبی شبه جنسی، جهش و جریان ژنی باشد. از آنجایی که تاکنون بررسی‌های کمی روی این عامل بیمارگر صورت گرفته



## REFERENCES

1. Afek, H., Szejnberg, A. & Solel, Z. (1990). A rapid method for evaluating citrus seedling resistance to foot rot caused by *Phytophthora citvophthora*. *Plant disease*, 74: 66-68.
2. Alizadeh, A., Alaei, H. & Ershad, J. (1999). Review etiology of dieback of pistachio trees in Rafsanjan. *Journal of Modares Agricultural Science*, 1(2), 53-63.
3. Aminaee, M. M. (1993). Major fungal disease of pistachio trees in Iran. In: Proceedings of 6<sup>th</sup> International Congress on Plant Pathology, July 28-August 6, Montreal, Canada, pp. 281.
4. Azevedo, A. C. S., Furlaneto, M. C., Sosa-Gómez, D. R. & Fungaro, M. H. P. (2000b). Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates. *Scientia Agricola*, 57(4), 729-732.
5. Barker, A. P., Horan, J. L., Slechta, E. S., Alexander, B. D. & Hanson, K. E. (2014). Complexities associated with the molecular and proteomic identification of *Paecilomyces* species in the clinical mycology laboratory. *Medical Mycology*, 52(5), 537-545.
6. Cantone, F. A. & Vandenberg, J. D. (1998). Intraspecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycological Research*, 102(2), 209-215.
7. Dalleau-Clouet, C., Gauthier, N., Risterucci, A. M., Bon, M. & Fargues, J. (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Molecular Ecology Notes*, 5(3), 496-498.
8. Ebrahimi, S. (2012). *Study on genetic diversity and Pathogenic Progression of Paecilomyces variotii isolates in Kerman province*. M.Sc. thesis, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran.
9. Ebrahimi, S., Sabbagh, S. K. & Aminaee, M. (2015). Genetic diversity of *Paecilomyces variotii* isolates by SSR marker in Kerman province, Iran. *Mycologia Iranica*, 2(1), 38-45
10. Fargues, J., Bon, M. -C., Manguin, S. & Couteaudier, Y. (2002). Genetic variability among *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from various geographical and host insect origins based on the rDNA-ITS regions. *Mycological Research*, 106(09), 1074-1076.
11. Ghelichi, M., Mohammadi, A.H., Haghdel, & Eskandari, A. (2014). Investigation of pathogenicity of *Paecilomyces variotii*, *Stemphylium sp.* and *Nattrassia mangifera* and optimal growth temperature associated with each species. In: Proceedings of the 1<sup>st</sup> Congress of Pistachio, August 28-August 30, Kerman, Iran, pp. 112.
12. Groll, A. & Walsh, T. (2001). Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clinical Microbiology and Infection*, 7, 8-24.
13. Heidarian, R., Fotouhifar, Kh., Mohammadi, A., Javan-Nikkhah, M., Debets, F. & Aanen, D. (2015). Phylogeny of genus *Paecilomyces* sp., the causal agent of pistachio die-back disease in Iran. In: Proceedings of 2<sup>nd</sup> Iranian Mycological Congress, 23-25 Aug, University of Tehran, Karaj, Iran, p.30
14. Hoog, G. S., Guarro, J., Gene, J. & Figueras, M. J. (2000). *Atlas of Clinical Fungi*. (2th ed.) Centraalbureau voor schimmelcultuur Utrecht, The Netherlands.
15. Houbraken, J., Verweij, P. E., Rijs, A. J. M. M., Borman, A. M. & Samson, R. A. (2010). Identification of *Paecilomyces variotii* in clinical samples and settings. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8), 2754.
16. Inglis, P. W., Sarmiento, R. B. C., Gavião, C. F. C. & Valadares-Inglis, C. (2005). DNA finger printing of *Paecilomyces* strains of potential use for the biological control of pests. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1487-1492.
17. Karaoglu, H., Lee, C. M. Y. & Meyer, W. (2005). Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 22(3), 639-649.
18. Mozaffari, V., Malakuti, M., Khaldbarin, B. & Bybordi, M. (2005). Review several agents of pistachio dieback and control with optimal nutrition. *Journal of Science and Soil*, 19(2), 154-164
19. Pastor, F. & Guarro, J. (2006). Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(10), 948-960.
20. Peakall, R. & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5, genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.
21. Rohlf, F. J. (1998). NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.02 User Guide.
22. Samson, R., Houbraken, J., Varga, J. & Frisvad, J. C. (2009). Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssosclamyces* and its *Paecilomyces* anamorphs. *Persoonia*, 22, 14.
23. Samson, R. A. (1974). *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6, 1-116.
24. Tigano-Milani, M. S., Honeycutt, R. J., Lacey, L. A., Assis, R., McClelland, M. & Sobral, B. W. (1995). Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65(3), 274-282.

25. Yanna, W., Laifa, W., Chungen, P., Yong, L. & Guozhong, T. (2006a). Intraspecific Polymorphism in *Paecilomyces lilacinus* by Analysis of RAPD. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 3, 15-24.
26. Yanna, W., Laifa, W., Chungen, P., Yong, L. & Guozhong, T. (2006b). Intraspecific Polymorphism in *Paecilomyces Lilacinus* by Analysis of RAPD. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 3, 007.
27. Yeh, F. C., Yang, R. C. & Boyle, T. B. J. (1999). *POPGENE version 1.31, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide* Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Canada.